

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Inhibierung von Methyltransferasen und
Click-chemische Methoden zur selektiven Modifikation von
Oligonukleotiden**

von

Simon Warncke

aus

München

2010

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung für die Fakultät für Chemie und Pharmazie der LMU München vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Thomas Carell betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 23. 03. 2010



Simon Warncke

Dissertation eingereicht am 16. 04. 2010

1. Gutachter: Prof. Dr. T. Carell
2. Gutachter: Prof. Dr. T. Bein

Tag der mündlichen Prüfung: 22. 06. 2010

Gewidmet meiner Familie

„Ich lerne noch.“
Michelangelo

Danksagung

Allen voran möchte ich meinem Doktorvater *Prof. Dr. Thomas Carell* danken, dass er mich in seine Forschungsgruppe aufgenommen hat und mir durch seine Unterstützung sowohl in wissenschaftlicher als auch in finanzieller Hinsicht ermöglichte, diese Doktorarbeit anzufertigen. Die gebotenen, hervorragenden Arbeitsbedingungen sowie die interessante Aufgabenstellung trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Doktorarbeit bei. Auch wenn die Ergebnisse im Labor anfangs eher ernüchternd waren, verstand *Prof. Carell* es stets, mir durch motivierende Gespräche das nötige Selbstvertrauen in die eigene Arbeit zurückzugeben. Bei Herrn *Prof. Dr. Thomas Bein* möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Koreferats und den Mitgliedern der Prüfungskommission für ihr Mitwirken an der mündlichen Prüfung bedanken.

Den Mitarbeitern der analytischen Abteilung des Departments Chemie der LMU München danke ich für die Anfertigung der Massen- und Kernresonanzspektren.

Sabine Schneider, Aline Gégout, Thomas Schultz, Philipp Gramlich, Markus Müller, Malte Winnacker (sorry – hab den Fishing-Teil wieder rausgenommen), *Robert Born* und meinem Vater gilt mein besonderer Dank, da sie ihre Zeit zum Korrekturlesen dieser Arbeit geopfert haben.

Slava Gärtner danke ich für ihre Unterstützung in organisatorischen Belangen, *Sabine Voß* und *Claudia Gräf* für ihr Engagement, damit der Laboralltag problemlos ablaufen konnte. *Markus Müller* danke ich für seine Hilfe bei sämtlichen IT-Belangen.

Meine beiden Praktikanten, *Steffen Ghali* (Oktaarginine) und *Michael Pangerl* (Fishing-Experimente) haben mich tatkräftig unterstützt – Danke dafür und weiterhin viel Erfolg.

Meinen Kooperationspartnern *Lothar Schermelleh, Philipp Gramlich, Aline Gégout*, und *Axel Schlossbauer* danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit. Es hat mir viel Freude gemacht!

Insbesondere bezüglich der Forschung möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe (in immer wechselnder Besetzung) meinen Dank aussprechen. Durch den Austausch von Ideen und der gemeinsamen Erörterung verschiedenster Problemstellungen, konnte ich mir das Eine oder Andere Experiment sparen.

Der Start meiner wissenschaftlichen Arbeiten im Arbeitskreis *Carell* begann mit dem Einzug in das Fk-Lab mit den Kollegen *Philipp Gramlich* und *Antonio Manetto*. Mit beiden verbindet mich eine großartige Freundschaft und ich danke euch für die tolle Zeit, die wir miteinander verbracht haben (mit *Phil* schon seit TUM-Zeiten) – und im Moment mit *Antonio* bei der baseclick GmbH verbringe. Mit *David Kuch* kam ein weiterer Verbündeter bezüglich Musik (hard and heavy!) sowie des selben Themengebiets in die „Großraumdisse F4.045“. Vielen

Dank für die schonungslosen Gruppen-emails, welche immer wieder zur Erheiterung beigetragen haben. *Ralf Strasser*, *Carsten Pieck*, *Sabine Schneider*, *Melanie Maul* und *Markus Müller* möchte ich dafür danken, dass sie mir bei biochemischen Fragestellungen immer behilflich waren.

Explizit möchte ich mich bei meinen Freunden *Thomas Schultz* (u. a. für die inspirierenden Abende – Dich mit nur ein paar Worten abzuspeisen grenzt schon an Frechheit, aber ich hoffe Du wirst es mir nachsehen), *Ernst Schöniger* (natürlich fürs Fische fangen und die immerwährende Angst unfreiwillig über Bord gehen zu müssen) und *Ludwig Kaspar* (fürs nicht Fische fangen ☺) bedanken. Vielen Dank auch an *Robert Born* und *Sebastian Bareyt* für die gemeinsame Zeit an der TUM bzw. LMU.

Vielen Dank auch an die baseclick GmbH und die BASF Venture Capital, dass ich die Möglichkeit bekam, an der Entstehung dieser Firma mitwirken zu können. Es macht großen Spaß und ich hoffe es geht weiter!

Mein ganz besonderer Dank gebührt meiner Freundin *Aline Gégout*, die mir das letzte Jahr meiner Doktorarbeit unheimlich versüßt hat und mich während der entbehrungsreichen Zeit des Arbeitens und Schreibens massiv unterstützt hat. Danke für dein Verständnis!

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken! Ohne sie wäre mein Interesse an den Naturwissenschaften vielleicht nie geweckt worden. Während der ganzen Zeit meiner Ausbildung haben mich meine Eltern vorbehaltlos unterstützt und mir dieses exzellente Studium ermöglicht. Ich danke euch dafür! Leider war es meiner Mutter nicht mehr vergönnt meinen Abschluß mitzerleben.

Publikationen

1. P. M. E. Gramlich, S. Warncke, J. Gierlich, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3442-3444. Click-click-click: single to triple modification of DNA.
2. S. Warncke, A. Gégout, T. Carell, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 728-734. Phosphorothioation of oligonucleotides strongly influences the inhibition of bacterial (M.HhaI) and human (Dnmt1) DNA methyltransferases.
3. A. Schlossbauer, S. Warncke, P. M. E. Gramlich, A. Manetto, T. Carell, T. Bein, *Angew. Chem.* **2010**, *49*, 4734-4737. A Programmable DNA-Based Molecular Valve for Colloidal Mesoporous Silica.

Posterbeitrag

S. Warncke, A. Gégout, D. Kuch, T. Carell; New suicide substrates for the human methyltransferase DNMT1. **Juni 2008**, München, Deutschland, *Evaluation of the Collaborative Research Center SFB646, "Networks in genome expression and maintenance"*.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Summary	5
3	Einführung	9
3.1	Struktur und Aufgaben der DNA	10
3.2	Regulation der Genexpression.....	13
3.2.1	Kontrolle der Transkription.....	14
3.2.2	Epigenetik	16
3.2.3	Histonmodifikation und Chromatinstruktur	16
3.3	DNA-Methylierung	19
3.3.1	DNA-Methyltransferasen	21
3.3.2	DNA-Methylierung, Histonmodifikation und Genexpression	26
3.3.3	DNA-Demethylierung	30
3.4	Epigenetik und Krankheitsentstehung	32
3.4.1	Epigenetik und Krebs.....	33
3.4.2	Ursachen der fehlerhaften Methylierungsmuster	36
3.5	Methyltransferaseinhibitoren	37
3.5.1	Wirkungsmechanismus der Nukleosidinhibitoren	38
3.5.2	Eigenschaften und Anwendung der Nukleosidinhibitoren 4, 5 und 7	40
3.5.3	Grenzen der Behandlung mit Methyltransferaseinhibitoren.....	42
4	Aufgabenstellung und Inhalt der Arbeit.....	43
5	Inhibierung von Methyltransferasen	44
5.1	Einfluss von Phosphorothioatmodifikationen auf die Inhibierung von Methyltransferasen durch kurze DNA-Doppelstränge	44
5.1.1	Einleitung und Aufgabenstellung	44
5.1.2	Synthese des dC ^F -Bausteins 11	49
5.1.3	Synthese und Reinigung der DNA-Stränge	52

5.1.4	Charakterisierung der DNA-Stränge	57
5.1.5	<i>In vitro</i> -Untersuchungen I: Aktivitätsassays	62
5.1.6	<i>In vitro</i> -Untersuchungen II: Zellstudien	80
5.1.7	Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick	86
5.2	Carbozyklisches 5-Aza-2'-desoxycytidin: Ein Inhibitor der humanen Methyltransferase DNMT1?	90
5.2.1	Einleitung und Aufgabenstellung	90
5.2.2	Synthese des carbozyklischen 5-Aza-2'-desoxycytidins (15)	91
5.2.3	Stabilitätstests.....	92
5.2.4	Auswirkung von carbdC ^N auf den globalen genomischen Methylierungsgrad von HCT116-Zellen.....	95
5.2.5	Auswirkung von carbdC ^N auf die Zellproliferation von HCT116-Zellen.....	97
5.2.6	Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick	98
6	Selektive Modifikation von DNA durch die Cu(I)-katalysierte Alkin-Azid-Zykloaddition.....	101
6.1	Einleitung und Aufgabenstellung	101
6.2	Synthese und Clickreaktion von Cy3-N₃ und Arg₈-N₃	105
6.2.1	Cy3-N ₃ 27	105
6.2.2	Arg ₈ -N ₃ 49	108
6.2.3	Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick	110
6.3	Synthese eines programmierbaren, DNA-basierten Kappensystems für nanoporöse Silikapartikel	111
6.3.1	Einleitung und Aufgabenstellung	111
6.3.2	Synthese des Kappensystems und Experimente zur temperaturbasierten Öffnung	112
6.3.3	Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick	120
7	Experimenteller Teil	121
7.1	Organisch-chemische Synthese	121
7.1.1	Material und Methoden	121
7.1.2	Synthese des dC ^F -Bausteins 11	127
7.1.3	Synthese des Alkin-modifizierten Nukleosids 24	133
7.1.4	Synthese des Cy3-Azids 27	138

7.1.5	Synthese des Arg ₈ -Azids 49	143
7.1.6	Click-Chemie	144
7.2	Biochemische Synthese	145
7.2.1	Material und Methoden	145
7.2.2	Stabilitätstests	149
7.2.3	EMSA Studien (<i>Electrophoretic Mobility Shift Assays</i>)	149
7.2.4	<i>In vitro</i> Aktivitätsassays	150
7.2.5	Zellkultur; Transfektion von DNA	150
7.2.6	Inkubation von HCT116-Zellen mit Nukleosiden	151
7.2.7	DNA Extraktion aus humanen HCT116-Krebszellen	152
7.2.8	Enzymatischer DNA-Totalverdau; Bestimmung des globalen dC ^M -Gehalts	152
7.2.9	Zellproliferationsassay	153
7.2.10	Kolokalisationsstudien	153
8	Anhang	155
8.1	Abkürzungsverzeichnis	155
8.2	Synthese des carbozyklischen 5-Aza-2'-desoxycytidins (15)	160
8.3	Synthese der nanoporösen Silikapartikel und fluoreszenzspektroskopische Experimente	164
8.4	Literaturverzeichnis	166

1 Zusammenfassung

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist der Speicher der genetischen Information aller Lebewesen unseres Planeten. Der genetische Code ist allerdings nicht alleine für die Abfolge entscheidender Prozesse in Zellen verantwortlich. Vielmehr werden viele Mechanismen von Informationen bestimmt, die der Basensequenz der DNA übergeordnet sind und deshalb als *epigenetisch* bezeichnet werden. In Säugetierzellen sind die zugrundeliegenden molekularbiologischen Mechanismen der Histonmodifikation und der Cytosin-C5 Methylierung der DNA maßgeblich an der Regulation der Genexpression, der Zelldifferenzierung sowie der embryonalen Entwicklung beteiligt. Die Entstehung vieler schwerer Krankheiten ist auf Störungen des genomischen Methylierungsmusters zurückzuführen. So weist das Genom von Krebszellen neben einem erniedrigten globalen Methylierungsgrad vor allem eine lokale Hypermethylierung von Promotorregionen auf, was dazu führt, dass Tumorsuppressorgene nicht mehr exprimiert und somit die natürlichen Kontrollmechanismen der Zelle ausgeschaltet werden. In diesem Zusammenhang wurden im ersten Teil der vorliegenden Arbeit Werkzeuge zur Manipulation der humanen Cytosin-C5-Methyltransferase DNMT1 entwickelt, mit denen es zum Einen möglich werden soll, molekularbiologische Mechanismen aufzuklären und zum Anderen auch, therapeutische Ansätze zu schaffen.

In Kapitel 5.1 wurde der Nukleosidinhibitor 5-Fluor-2'-desoxycytidin durch chemische Festphasensynthese innerhalb einer hemimethylierten DNMT1-Erkennungssequenz $d(C^FpG):d(GpC^M)$ in kurze DNA-Doppelstränge eingebaut, an die die Methyltransferase irreversibel gebunden und somit deren Methylierungsaktivität vollständig gehemmt werden sollte. Für einen späteren Einsatz in lebenden Zellen, wurde das Phosphordiesterückgrat dieser Stränge sowie deren Kontrollen teilweise durch Phosphorothioate ersetzt (Abb. 1.1 a)). Dies erhöhte deren Stabilität gegenüber der Hydrolyse durch Nukleasen deutlich und sollte verhindern, dass der Nukleosidinhibitor dC^F in genomische DNA integriert wurde. Nach der Synthese und Charakterisierung der Oligonukleotide wurde der Einfluss des Modifikationsgrads auf die Inhibitionswirkung der DNA-Stränge auf die bakteriellen Methyltransferasen M.HhaI und M.SssI sowie die humane Methyltransferase DNMT1 durch EMSA-Bindungsstudien und Restriktions-Schutzassays untersucht (Abb. 1.1 b)).

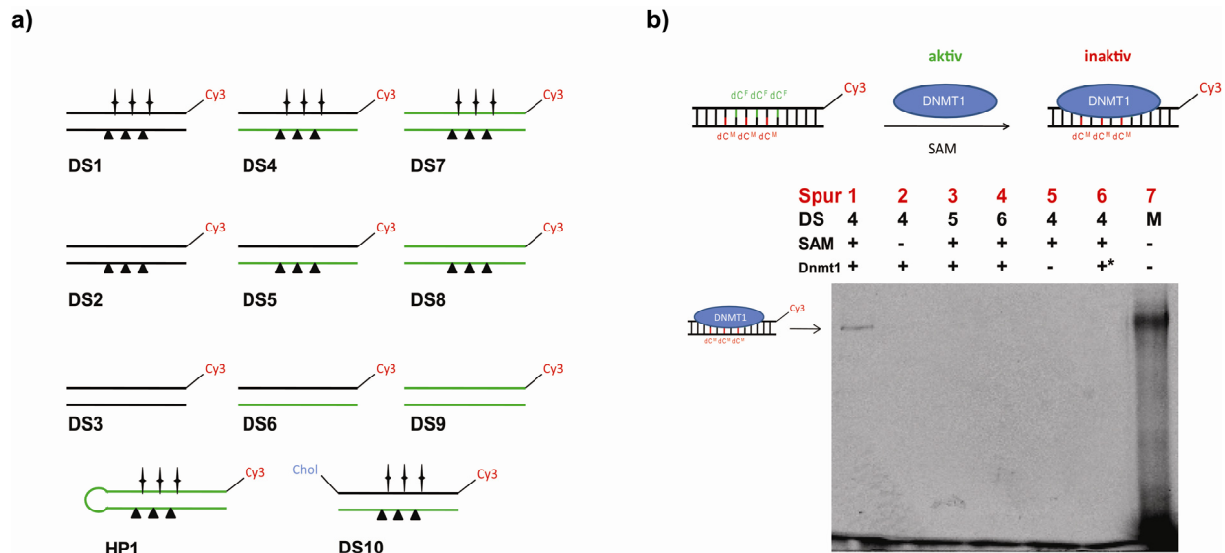


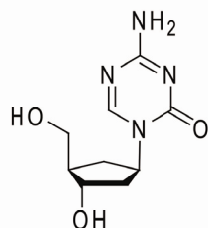
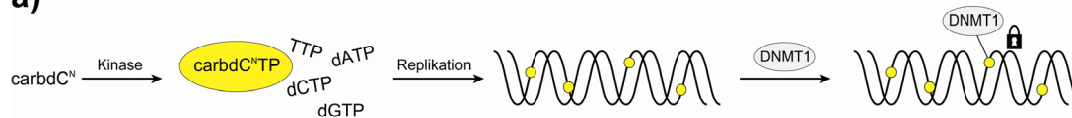
Abbildung 1.1 a) Übersicht über die verwendeten Konstrukte: Die Doppelstränge **DS1–DS3** besitzen ein natürliches Phosphordiesterückgrat (schwarz). **DS4–DS6** bestehen zur Hälfte aus Phosphorothioaten (grün), genauso wie **DS10**, welcher zusätzlich über eine Cholesterylgruppe verfügt. Die Duplexe **DS7–DS9** sind vollständig zu Phosphorothioaten umgewandelt worden, genauso wie die Haarnadel **HP1**. **b)** EMS-Assay der DNA-Stränge **DS4–DS6** mit DNMT1. Nur der aktive Inhibitor mit dem Suizidsubstrat dC^F , **DS4**, bildet in Anwesenheit des Kofaktors SAM mit dem Enzym einen kovalenten Komplex (Spur 1). ▲ = 5-Methyl-2'-desoxycytidin; † = 5-Fluor-2'-desoxycytidin; Chol = Cholesterol, Cy3 = Cyaninfarbstoff.

Nach Transfektion der Konstrukte in humane Tumorzellen (HCT116) konnte allerdings keine Senkung des globalen genomischen Methylierungsgrades erzielt werden. Dennoch wurden in dieser Studie wichtige Informationen über das Design einer neuen Generation von DNA-Inhibitoren für die humanen Methyltransferase DNMT1 gewonnen. Durch solche Konstrukte könnte es gelingen, die epigenetische Geninaktivierung in Tumorzellen rückgängig zu machen und möglicherweise auch an der Reprogrammierung differenzierter Zellen mitzuwirken.

In Kapitel 5.2 wurde das von A. Gégout synthetisierte carbozyklische Analogon **15** ($carbdC^N$) des bekannten DNMT1-Inhibitors 5-Aza-2'-desoxycytidin (dC^N) auf seine Stabilität in wässriger Lösung untersucht. **15** erwies sich im Gegensatz zu dC^N auch bei verschiedenen pH-Werten als sehr stabil und wurde nicht hydrolysiert. Die Behandlung von HCT116-Krebszellen mit **15** führte zu einem konzentrationsabhängigen demethylierenden Effekt. Der absolute Methylierungsgrad konnte durch Zugabe von **15** (1.0 mM) von 4.5 % auf 1.9 % herabgesetzt und das Wachstum der Zellen auf 38 % des Wachstums der Kontrollzellen gesenkt werden (Abb.1.2). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass **15** nach der Aufnahme in

HCT116-Zellen erfolgreich in genomische DNA eingebaut wurde und dort als Inhibitor der humanen Methyltransferase DNMT1 wirken konnte.

a)



15

b)

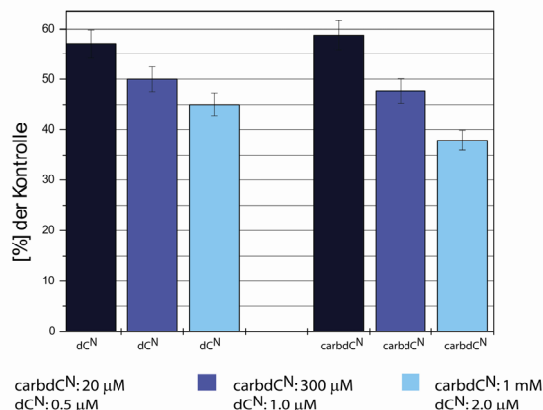


Abbildung 1.2 a) Möglicher Wirkmechanismus des carbozyklischen 5-Aza-2'-desoxycytidins (15). Nach Metabolisierung zum Triphosphat wird dieses in genomische DNA eingebaut, wo es im Kontext von CpG-Inseln als Suizidsubstrat für die humane DNMT1 wirkt. **b)** WST-1 Studie: Das Wachstum von HCT116-Krebszellen konnte bei Zugabe von 1 mM 15 auf 38 % des Wachstums der Kontrollzellen reduziert werden.

Der zweite Teil dieser Arbeit hatte die Modifikation von Alkin-modifizierter DNA durch die Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin-Zykloadditionsreaktion, kurz CuAAC oder Click-Reaktion genannt, zum Thema. Für die von *P. Gramlich* entwickelte, sequenzielle Click-Reaktion zur mehrfachen Modifikation von DNA mit verschiedenen Markern wurde das Cyaninfarbstoffazid Cy3-N₃ 38 synthetisiert (Abb. 1.3).

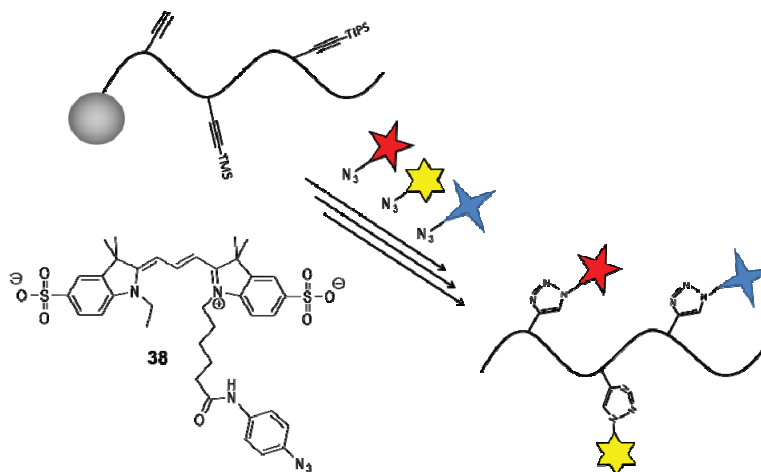


Abbildung 1.3 Schematische Darstellung der sequenziellen Click-Reaktion zur Funktionalisierung von DNA mit drei verschiedenen Markeraziden, wie dem Cy3-N₃ 38.

Dieser häufig zur DNA-Markierung verwendete Fluoreszenzfarbstoff wurde dann über CuAAC an DNA gebunden. Es wurde allerdings festgestellt, dass die chromophore Gruppe während der Reaktion teilweise abgespaltet wurde. Außerdem wurde das Peptid Oktaarginin über Festphasensynthese hergestellt, anschließend gereinigt, charakterisiert und zum Azid umgesetzt. Dieses Peptid sollte an DNA konjugiert werden und so den Transport von DNA-Duplexen in den Zellkern ermöglichen. Erste Versuche zur Synthese solcher DNA-Peptid-Konjugate durch Click-Chemie schlugen allerdings fehl, so dass hier größere Mengen des Peptids hergestellt werden müssen, um weitere Experimente durchführen zu können.

Das letzte im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Projekt wurde in Zusammenarbeit mit A. Schlossbauer aus der Arbeitsgruppe Bein bearbeitet. Dabei wurde ein Kappensystem für kolloidale mesoporöse Silikananopartikel entwickelt, das eine temperaturgesteuerte Freisetzung von Fluorescein-Molekülen erlaubte, welche vorher in dieses Material eingelagert wurden. Dazu wurde die Oberfläche der Silikananopartikel mit Aziden funktionalisiert, an welche anschließend doppelsträngige Alkin-modifizierte DNA über CuAAC gebunden wurde. Der nicht kovalent mit der Oberfläche verknüpfte DNA-Halbstrang trug eine Biotinfunktion, um die Poren des CMS-Materials später durch Avidin verschließen zu können. Die Öffnung der Poren erfolgte durch Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge bei entsprechender Temperaturerhöhung (Abb. 1.4). Über die Länge der Oligonukleotide ließ sich die Öffnungstemperatur steuern. Bei einer Länge von 15 Basenpaaren reichte dafür bereits eine Temperatur von 45 °C aus, während bei einem 25mer auf 65 °C erwärmt werden mußte.

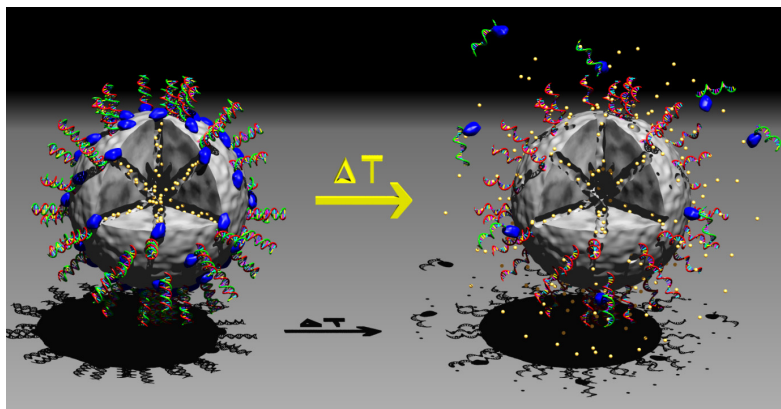


Abbildung 1.4 Temperaturbedingte Freisetzung von Fluorescein, welches vor dem Verschluß durch Avidin in die DNA-funktionalisierten CMS-Partikel eingelagert wurde.

2 Summary

The macromolecule deoxyribonucleic acid (DNA) carries the genetic information of all living organisms on our planet. However, the genetic code itself is not alone responsible for the sequence of fundamental cellular processes. In fact, these mechanisms are determined by information beyond the genetic code of the nucleobases, which is therefore termed *epigenetic*. In mammals, the underlying mechanisms of histone modification and cytosine-C5 methylation are substantially involved in the regulation of gene expression, cell differentiation and embryonic development. Thus, disorders of the genomic methylation patterns can cause severe human disease. In tumor cells, in addition to a reduced overall genomic methylation level, local hypermethylation of gene promoters can be observed. This process leads to repression of tumor suppressor genes and subsequently to the malfunctioning of cellular control mechanisms. In this context, instruments for manipulating the human cytosine-C5 methyltransferase Dnmt1 were developed in the first part of the presented work, thus being able to elucidate the molecular biological background as well as creating therapeutic approaches.

In chapter 5.1 the nucleoside inhibitor 5-fluoro-2'-deoxycytidine was integrated into the hemimethylated Dnmt1 target motif $d(C^FpG):d(GpC^M)$ of short DNA double strands, designed to irreversibly bind and hence inhibit the methylation activity of the enzyme. In order to utilize these constructs in living cells later on, the phosphodiester backbone of these DNA strands as well as their controls was substituted at varying levels by phosphorothioates (Fig. 2.1 a)). This increased their stability against nuclease hydrolysis, thus preventing the nucleoside inhibitor dC^F from being integrated into genomic DNA. After the synthesis and characterization, the influence of the degree of modification on the inhibition of the bacterial methyltransferases M.HhaI and M.SssI as well as the human methyltransferase Dnmt1 was evaluated by means of EMSA binding studies and restriction-protection-assays (Fig. 2.1 b)).

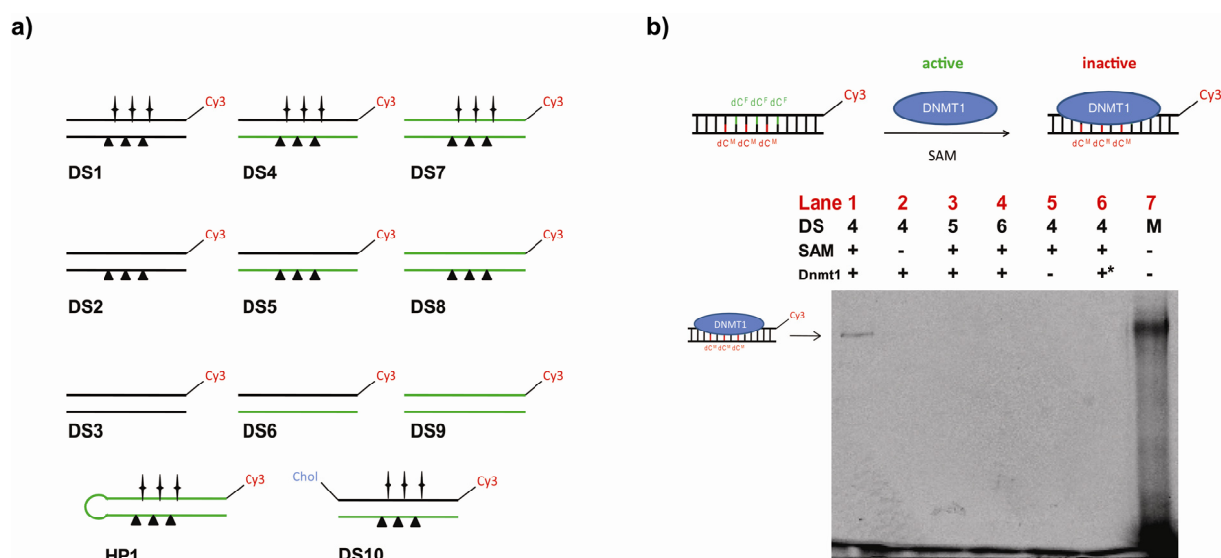


Figure 2.1 a) Overview of the prepared DNA-strands: The double strands **DS1–DS3** possess a natural phosphodiester backbone (black). One of the two single strands of **DS4–DS6** features a full phosphorothioate backbone (green), as well as **DS10**, which in addition carries a cholesteryl-moiety. Duplexes **DS7–DS9** and **HP1** feature a fully modified phosphorothioate backbone. **b)** EMS-Assay of **DS4–DS6** with DNMT1. Only the inhibitor **DS4** with the suicide substrate dC^F , forms a covalent adduct with the enzyme (Lane 1) in the presence of the cofactor SAM. \blacktriangle = 5-methyl-2'-deoxycytidine; \uparrow = 5-fluoro-2'-deoxycytidine; Chol = cholesterol, Cy3 = cyanine dye.

However, after transfecting the constructs into human cancer cells (HCT116), no reduction of the global genomic methylation level could be obtained. Nevertheless, important information about the design of a new class of DNA-inhibitors for the human methyltransferase was obtained. These compounds may allow reversal of epigenetic gene silencing in tumor cells and the reprogramming of differentiated cells.

In chapter 5.2, the carbocyclic analogue **15** (carbdc^N) of the known Dnmt1-inhibitor 5-azadeoxycytidine (dC^N), which has been synthesized by A. Gégout, was tested concerning its stability in aqueous solution. In contrast to dC^N , **15** was shown to be stable at different pH and was not hydrolyzed. Treatment of HCT116 cancer cells with **15** resulted in a concentration-dependent demethylating effect. After addition of carbocyclic 5-azadeoxycytidine (1.0 mM), the global methylation level was reduced from 4.5 % to 1.9 % and cell growth decreased to 38 % (Fig. 2.2). These results suggest that carbocycle **15** was successfully incorporated into genomic DNA after its uptake in HCT116 cells, hereby acting as an inhibitor for the human methyltransferase Dnmt1.

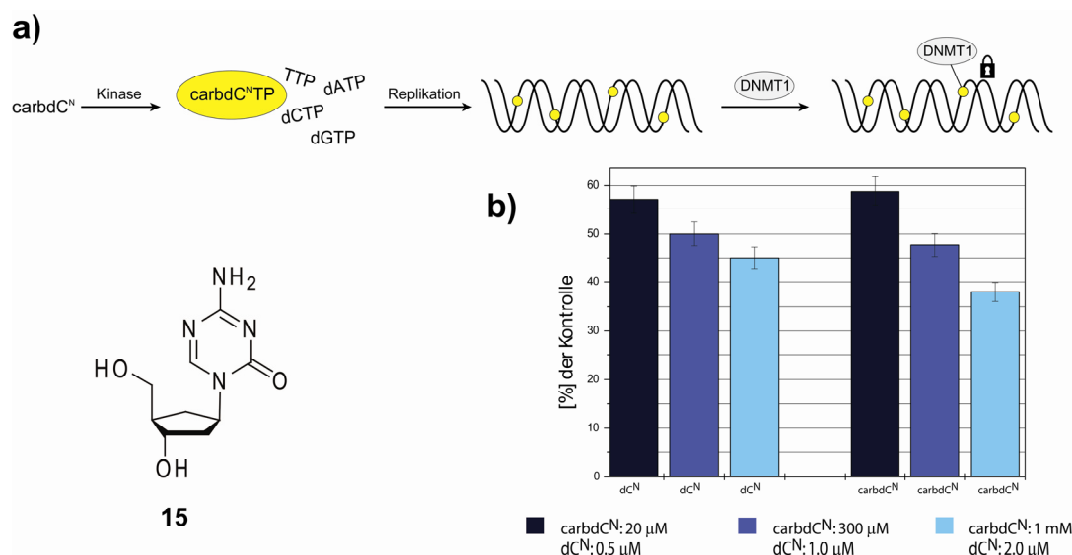


Figure 2.2 a) Possible mechanism of action of carbocyclic 5-azadeoxycytidine (**15**). After being metabolized to the triphosphate, it was incorporated into genomic DNA, acting as suicide substrate for the human Dnmt1 in the context of CpG-islands. **b)** WST-1 study: The growth of HCT116 cancer cells could be reduced to 38 % in comparison to the control after addition of **15** at a 1 mM concentration.

The second part of this work deals with the modification of alkyne-modified DNA by the copper(I)-catalyzed azide-alkyne-cycloaddition reaction (click-reaction, CuAAC). *P. Gramlich* developed a sequential click-reaction for the modification of DNA with multiple different labels. To this end, the cyanine-dye azide Cy3-N₃ **38** was synthesized (Fig. 2.3).

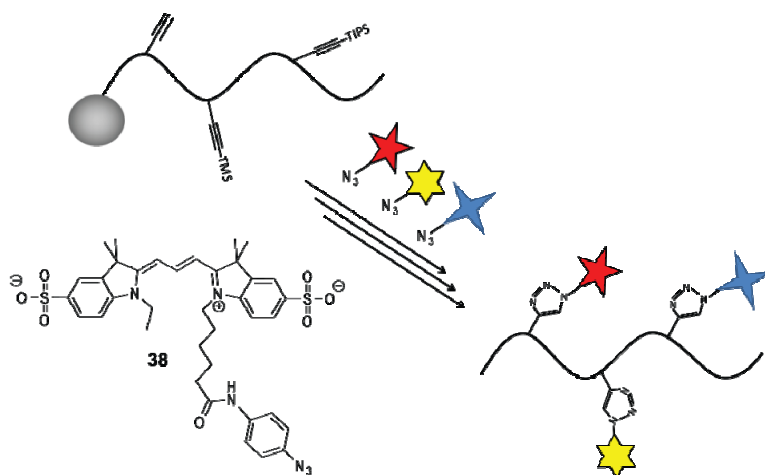


Figure 2.3 Schematic description of the sequential click-reaction for the functionalization of DNA with three different labels like Cy3-Azid **38**.

This dye is one of the most commonly used dyes for labeling DNA, and has been conjugated to DNA via CuAAC. However, the chromophore was cleaved to a certain

extent during the reaction. In addition the peptide octa-arginine was synthesized via solid phase-synthesis, purified, characterized and transformed into its azide. The peptide should then be conjugated to DNA, thus enabling the transport of DNA-duplexes into the cell nucleus. First attempts to synthesize such DNA-peptide-conjugates failed necessitating the synthesis of higher amounts of peptide to perform further experiments.

The last project within this thesis was carried out in cooperation with A. Schlossbauer from the *Bein* group. A cap system for colloidal mesoporous silica was developed, allowing the temperature-controlled release of fluorescein molecules, which had previously been embedded into this material. To this end, the surface of the silica particles was functionalized with azides, to which double stranded alkyne-modified DNA was coupled via click-reaction. In order to close the pores of the CMS-particles with avidin reversibly, the DNA-single strands of the duplexes that were not covalently bound to the surface, featured a biotin-function. The pores were opened by dissociation of the DNA-double strands heating them up to appropriate temperature, which could be controlled by the length of the oligonucleotides (Fig. 2.4). A temperature of 45 °C was sufficient for melting 15mers, whereas 25mers had to be heated to 65 °C.

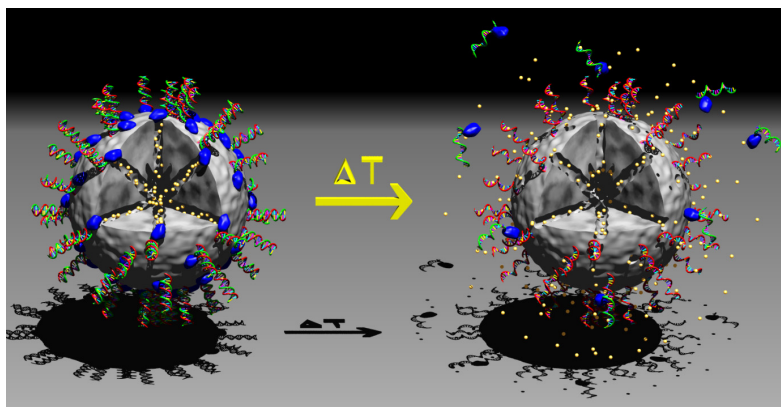


Figure 2.4 Thermoresponsive release of fluorescein from DNA functionalized mesoporous silica which has been closed with avidin.

3 Einführung

Das Alter des Universums beträgt nach neuesten Erkenntnissen und Berechnungen ungefähr 13,7 Milliarden Jahre, wobei die Entwicklung der Erde erst vor etwa 4,6 Milliarden Jahren begann.^[1] Alle Lebewesen unseres Planeten haben ein Molekül gemeinsam: die Desoxyribonukleinsäure (DNA) - *das* Molekül des Lebens. In ihrer Struktur steckt die Erbinformation, die den Aufbau aller Proteine bestimmt. In ihr sind die Anweisungen, nach denen Zellen wachsen und sich teilen, ebenso verschlüsselt wie die Angaben, nach denen sich befruchtete Eizellen in die Vielzahl spezialisierter Zellen differenzieren, die für ein reibungsloses Funktionieren höherer Pflanzen und Tiere unerlässlich sind. Heute geht man davon aus, dass zu Beginn des Lebens nur RNA (Ribonukleinsäure) existierte, welche sowohl Informationen speichern, als auch katalytische Funktionen wahrnehmen konnte (RNA-Welt Hypothese).^[2] Diese sich selbst replizierenden RNA Moleküle haben die Grundlage für den Evolutionsprozess geliefert, aus dem die Abermillionen verschiedenen Lebensformen hervorgegangen sind, die seit der Entstehung der ersten Organismen vor rund drei bis vier Milliarden Jahren unsere Erde bewohnt haben (Abb. 3.1).

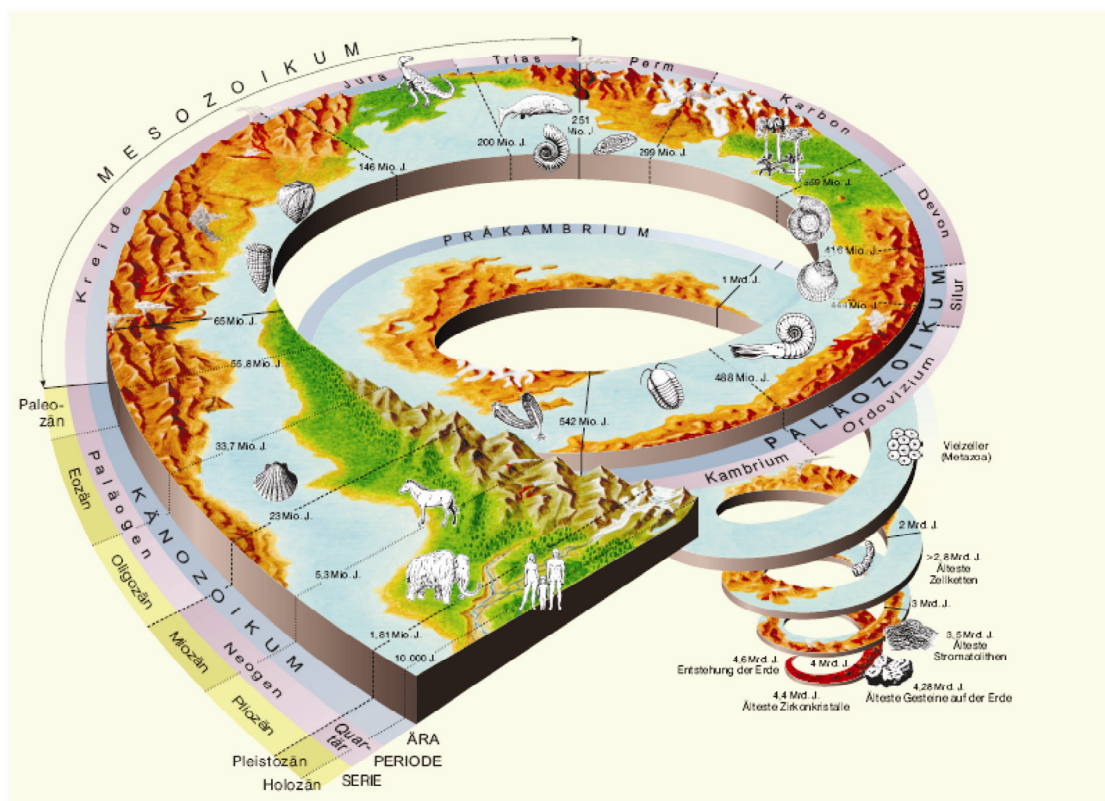


Abbildung 3.1 Zeitspirale der Entstehung und Entwicklung des Lebens auf der Erde.^[3]

3.1 Struktur und Aufgaben der DNA

Obwohl die DNA bereits 1869 von *Miescher* entdeckt wurde, konnten die einzelnen Bestandteile (Desoxyribose, Phosphorsäurerest und vier Nukleobasen) erst knapp 50 Jahre später identifiziert werden.^[4-6] 1944 zeigte *Avery* durch seinen Pneumokokken Versuch, dass die DNA der Träger der Erbsubstanz ist.^[7] Basierend auf den Ergebnissen von *Chargaff* aus dem Jahr 1950, die zeigen, dass die Nukleobasen Adenin (A) und Thymin (T), sowie Guanin (G) und Cytosin (C) jeweils im Verhältnis eins zu eins auftreten und den DNA-Röntgendiffraktogrammen von *Franklin*, erstellten *Watson* und *Crick* 1953 das räumliche Modell der DNA-Doppelhelix (Abb. 3.2).^[8-10]

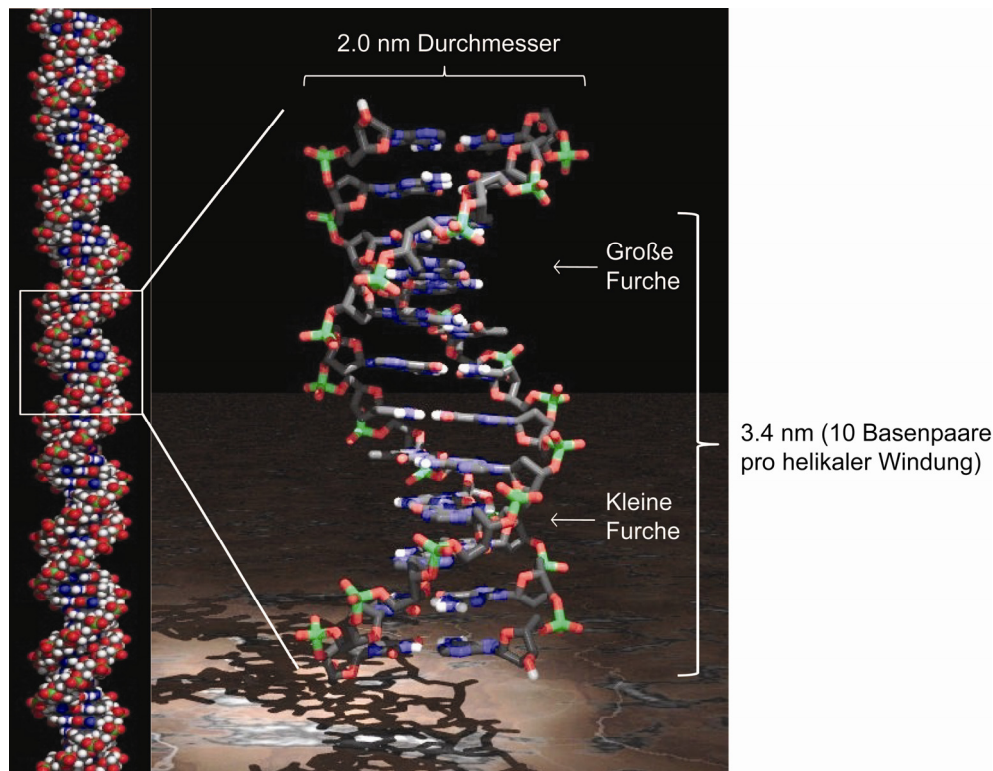


Abbildung 3.2 Struktur der B-DNA-Doppelhelix im *ball*- (links) und *stick*-Modell (rechts).

Die vier Nukleoside Desoxyadenosin (dA), Desoxythymidin (dT), Desoxyguanosin (dG) und Desoxycytidin (dC), die durch Verknüpfung der jeweiligen Nukleobase mit der 1-Position des Zuckers 2-Desoxyribofuranose entstehen, sind untereinander über Phosphordiesterbindungen zwischen den 3'- und 5'-Positionen der Zuckereinheiten

verbrückt. Die DNA-Doppelhelix, gebildet aus zwei langen, antiparallelen Einzelsträngen, wird durch Wasserstoffbrücken zwischen den nach innen gerichteten, sich gegenüberliegenden Basen A und T bzw. G und C sowie π -Stapelwechselwirkungen zusammengehalten. Da jede Base automatisch ihre korrespondierende Base im Gegenstrang determiniert, besteht die Möglichkeit der Replikation der gesamten DNA anhand eines einzelnen Stranges. Zucker und Phosphat bilden das nach außen gerichtete Rückgrat (Abb. 3.3).

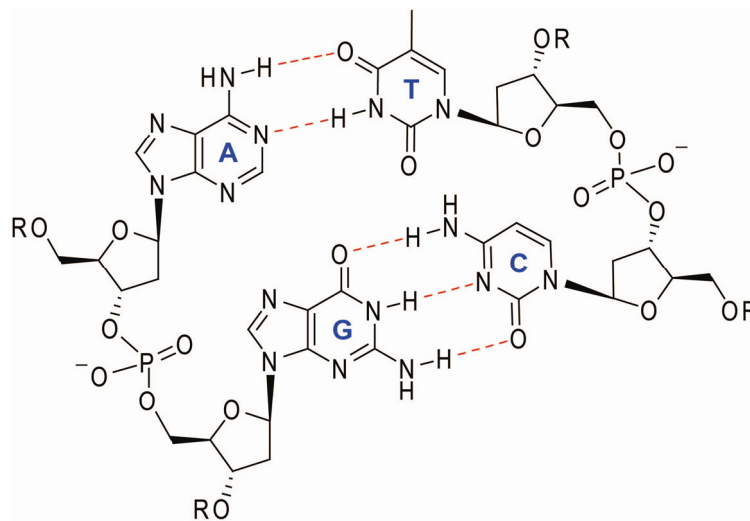


Abbildung 3.3 *Watson-Crick* Basenpaarung mit Wasserstoffbrücken (rot gestrichelt). A = Adenin; T = Thymin; G = Guanin; C = Cytosin.

Die Größe von natürlich vorkommenden DNA-Molekülen entspricht in erster Näherung der Menge an genetischer Information, die in ihr enthalten ist. So besteht das genetische Material von einigen Viren aus wenigen tausend Basenpaaren. Im Gegensatz dazu benötigen vielzellige Organismen wie Menschen, Tiere und Pflanzen mehrere hundert Millionen Basenpaare, um die umfangreichen und komplizierten Mechanismen, wie die Regulation des Stoffwechsels, den Aufbau der Zellen, die Entwicklung usw. steuern zu können. Die Informationen selbst sind in Form eines 4-Buchstabenalphabets in der DNA-Doppelhelix gespeichert. Ein Gen ist ein Abschnitt der DNA, der die Information zur Herstellung eines Proteins trägt. Damit eine Zelle ein entsprechendes Protein synthetisieren kann, muss sie den 4-Buchstaben-DNA-Code in den 4-Basen-RNA-Code übertragen (Transkription) und anschließend die mRNA-Nukleotid-Triplets in den 20-Aminosäure-Code der Proteine

übersetzen (Translation). Die Gesamtheit der vererbaren Informationen einer Zelle oder eines Organismus wird als das Genom des jeweiligen Lebewesens bezeichnet. In Eukaryoten besteht das Genom aus mehreren, einzelnen, langen DNA-Fäden, den Chromosomen, die in jedem Zellkern vorliegen und während der Mitose zu X-ähnlichen Strukturen kondensiert sind. Das Chromosom wird aus einem DNA-Proteinkomplex gebildet, dem Chromatin, welches in den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus in verschiedenen Zuständen existiert. Die wichtigste Verpackungsstufe von Chromatin ist das Nukleosom. Es wird aus acht Histonproteinen (Histon-Oktamer) mit je zwei Molekülen der Histone H2A, H2B, H3 und H4 aufgebaut, um das sich der DNA-Faden in zwei linksgerichteten superhelikalen Windungen schlingt. Die Ein- und Austrittsstelle der DNA wird von dem Histon H1 überdeckt, welches dem Partikel aufliegt. Das elektronenmikroskopische Bild der aneinandergereihten Nukleosomen ähnelt einer Perlenkette mit einem Durchmesser von 11 nm (Abb. 3.4).

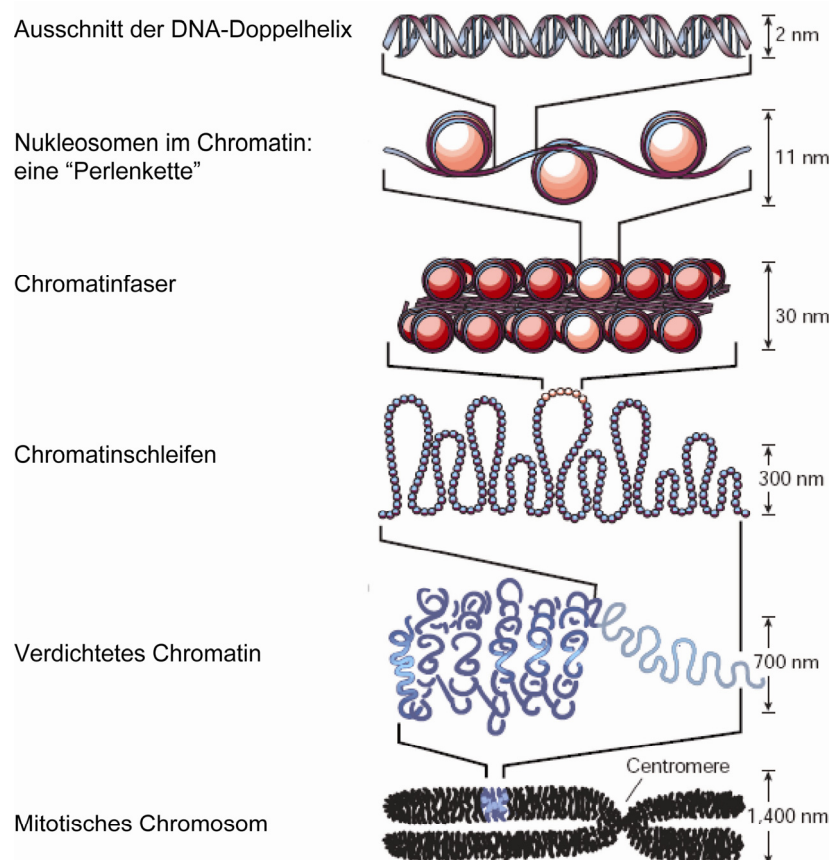


Abbildung 3.4 Organisation der genomischen DNA von Eukaryoten im Zellkern. Struktur der Chromatinfasern und der Chromosomen.

Durch Wechselwirkungen zwischen den Histonen in den Oktameren benachbarter Nukleosomen kommt es zu einer Faltung der nukleosomalen DNA und es entsteht eine Chromatinfaser von jetzt 30 nm Durchmesser. Die 30 nm Faser ihrerseits liegt geordnet in Form von Schleifen vor, die pro Schleife DNA-Abschnitte mit jeweils 50–100 Kilo-Basenpaaren enthält. Durch noch stärkere Verdichtung des Chromatins ergibt sich die extremste Packung der DNA, das mitotische Chromosom. Jede menschliche Körperzelle, außer den Gameten (Spermien bzw. Eizellen), besitzt zwei Kopien der Erbsubstanz ($2n = 46$ Chromosomen).^[11] Im Zuge des *Human Genome Project* konnte das menschliche Genom nahezu vollständig entschlüsselt und seine Größe auf über drei Milliarden Basenpaare beziffert werden. Die Anzahl der Gene wird auf etwa 25.000 geschätzt, allerdings gehen die Meinungen hier weit auseinander.^[12] Damit sich aber aus einer befruchteten Eizelle ein ausgewachsener Organismus entwickeln kann und dieser auch funktionsfähig bleibt, müssen diese Gene nach einem exakt aufeinander abgestimmten Muster aktiv werden. Die zugrunde liegenden hoch komplexen Regulations- und Kontrollmechanismen werden unter dem Begriff Genregulation zusammengefasst.

3.2 Regulation der Genexpression

Eine große Anzahl von Proteinen ist in allen Zellen vielzelliger Organismen vorhanden. Diese umfassen die wesentlichen Strukturproteine des Cytoskeletts und der Chromosomen, die wichtigsten Proteine des endoplasmatischen Reticulums und der Golgi-Membranen, ribosomale Proteine sowie die Enzyme der Glykolyse und anderer wichtiger Stoffwechselwege. Diese universellen Proteine werden häufig als Haushaltsproteine und die Gene, die für sie kodieren, als Haushaltsgene bezeichnet. Der Hauptteil der Gene unterliegt einer zelltyp-, entwicklungs- und signalabhängigen differentiellen Expression. Diese dynamische Expression von Genen ist eine fundamentale Voraussetzung aller grundlegenden Prozesse einer Zelle. Bei der Zellteilung, der Differenzierung, der Zellalterung und dem Zelltod werden unterschiedliche Proteine in genau definierten Abfolgen benötigt. Auch um auf Einflüsse von außen, wie Stress und Pathogene zu reagieren, sind Zellen auf eine dynamische Regulation der Genexpression angewiesen. Dazu kommt, dass in Eukaryoten eine Vielzahl von Zelltypen mit identischem Genotyp unterschiedliche

Aufgaben übernehmen, welche völlig verschiedene Programme von Genaktivitäten erfordern.

Die Regulation der Genexpression kann auf verschiedenen Ebenen erfolgen: Wann und wie oft ein Gen transkribiert wird, wie das primäre RNA-Transkript gespleißt oder prozessiert wird und welche mRNAs an den Ribosomen translatiert werden. Schließlich kann ein Protein auch noch nach seiner Synthese selektiv aktiviert oder inaktiviert werden (Abb. 3.5).

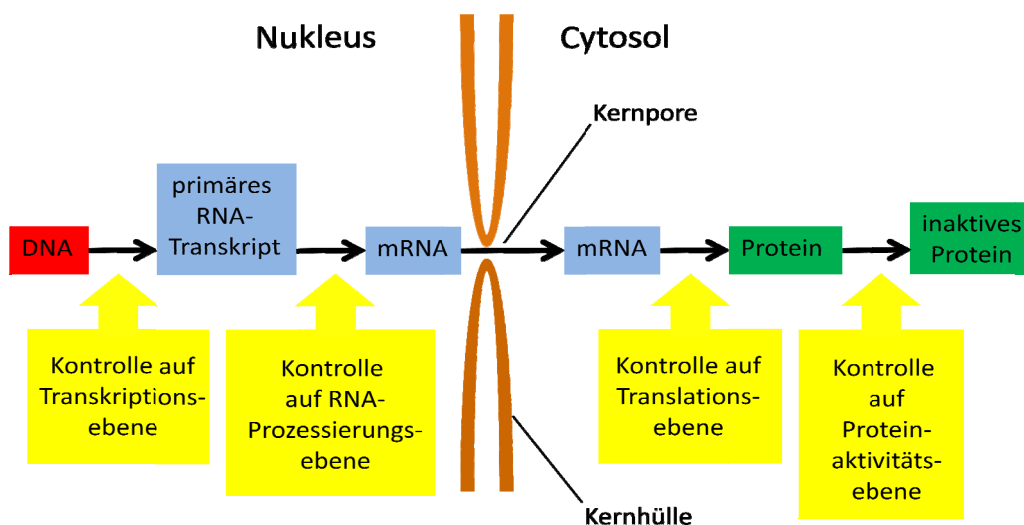


Abbildung 3.5 Kontrolle der eukaryotischen Genexpression.

Obwohl es für jeden der genannten Regulationsschritte Beispiele gibt, ist in eukaryotischen Zellen die Transkriptionskontrolle am wichtigsten. Dies ist sinnvoll, da nur die Kontrolle der Transkription verhindern kann, dass unnötige Intermediate synthetisiert werden. Aus diesem Grund soll im Folgenden nur auf diese erste Regulationsebene eingegangen werden.

3.2.1 Kontrolle der Transkription

Die Gene in Eukaryoten sind unterteilt in Kodierungs- und Nicht-kodierungssequenzen, die sogenannten Exons (*expressed regions*) und Introns (*intervening regions*). Introns werden ebenfalls transkribiert, aber dann aus der prä-mRNA herausgespleißt, bevor diese zur Translation aus dem Zellkern ausgeschleust wird. Lediglich die Exons verbleiben in der mRNA und werden in

die Aminosäuresequenz des zugehörigen Proteins übersetzt. Jedes Gen wird über bestimmte Basensequenzen (regulatorische Elemente), die in unterschiedlichen Entfernungen stromauf- und stromabwärts des Transkriptionsstarts liegen, kontrolliert. Der Startpunkt der Transkription, also die Stelle, an der die RNA-Polymerase mit der Synthese der prä-mRNA beginnt, liegt innerhalb der Promotorregion. Die Promotorsequenzen sind stark genspezifisch aufgebaut und zeigen neben gewissen Grundelementen, wie TATA-Box, CpG-Inseln oder *Inr*-Element, untereinander nur wenige Gemeinsamkeiten. Ihre Sequenzmotive sind Bindestellen für eine große Anzahl regulatorischer Proteine, den Transkriptionsfaktoren (TF). Darüber hinaus gibt es noch weitere Regulationselemente (*enhancer*), die bis zu einige tausend Basenpaare vom Transkriptionsstart entfernt liegen können (Abb. 3.6).

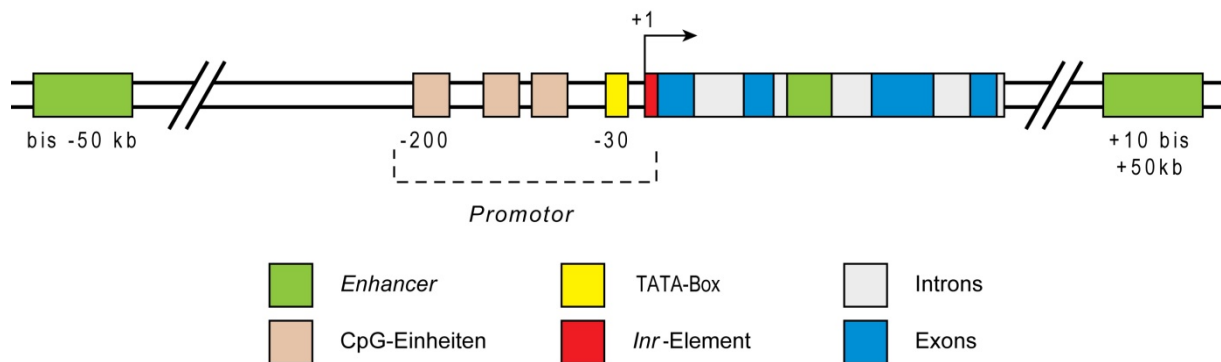


Abbildung 3.6 Schematischer Aufbau eukaryotischer Gene und ihrer regulatorischen Elemente. TATA-Box, CpG-Inseln und *Inr*-Element sind nicht in allen Genen vorhanden. Der Transkriptionsstart ist durch den Pfeil gekennzeichnet.

Die Initiation der Transkription eines Gens übernehmen die Transkriptionsfaktoren (Aktivatoren), die die RNA-Polymerase an den Transkriptionsstart vermitteln. Dies erfolgt hochspezifisch und meist ist eine Vielzahl dieser Aktivatoren für die Aktivierung eines Gens notwendig. Ihre Gegenspieler sind die Repressoren (wie die *Polycomb group* Proteine), die die Transkription eines Gens reduzieren oder abschalten. Die Transkriptionsfaktoren sind Empfänger von Signalen aus dem Cytoplasma oder der Zelloberfläche und sind in hochkomplexe Signaltransduktionswege eingebunden.^[13, 14]

Darüberhinaus kommt der Chromatinstruktur, in der das entsprechende Gen eingebettet ist, bei der Initiation der Transkription eine besondere Bedeutung zu. Die

molekularbiologische Disziplin, die sich u. a. auch mit der Regulation der Packungsdichte des Chromatins einer Zelle beschäftigt, ist die Epigenetik.

3.2.2 Epigenetik

Die Epigenetik versucht die molekularbiologischen Mechanismen aufzuklären, die sich *jenseits* (griech. *epi-*) der genetischen Grundprinzipien bewegen. Anders ausgedrückt beschäftigt sie sich mit den genetischen Auswirkungen von Prozessen, die nicht (allein) von der Nukleotidsequenz bestimmt werden, sondern durch bestimmte ihr übergeordnete Vorgänge.^[15, 16] Dabei ist es möglich, den Phänotyp einer Zelle zu verändern, ohne ihren Genotyp zu beeinflussen. Epigenetische Prozesse haben dabei weitreichende und vererbare Konsequenzen für die genetische Aktivität und somit nicht nur für die einzelne Zelle, sondern für den gesamten Organismus. Die Epigenetik ist eines der am schnellsten wachsenden Forschungsgebiete überhaupt. Sie ist zu einem zentralen Thema in biologischen Studien zur Entwicklung und Krankheitsentstehung, insbesondere der Krebsforschung geworden.^[17-19]

Die beiden wesentlichen Bereiche der Epigenetik sind die DNA-Methylierung und die Modifizierung der Histone, welche in enger Beziehung zueinander stehen und sich in weiten Teilen überschneiden. Daneben existiert noch eine dritte Möglichkeit, bei der nichtkodierende RNA Einfluss auf bestimmte epigenetische Prozesse nehmen kann. Auf dieses Thema soll hier aber nicht näher eingegangen werden.^[2, 20, 21]

3.2.3 Histonmodifikation und Chromatinstruktur

Wie bereits in Kapitel 3.1 beschrieben, ist das eukaryotische Genom im Zellkern in Form des Chromatins zu Strukturen höherer Ordnung gepackt. Die grundlegende, sich wiederholende Einheit dieser Anordnung ist das Nukleosom, bei dem 145-147 Basenpaare der DNA um ein *Core*-Histon gewickelt sind. Jedes *Core*-Histon besteht im Wesentlichen aus einer globulären Domäne. Lediglich der Aminoterminus wird als flexible, bezüglich der Primärstruktur hoch konservierte Kette an der Oberfläche des Nukleosoms präsentiert und ist dort Gegenstand zahlreicher posttranslationaler Modifikationen, die Einfluss auf die Packungsdichte des Chromatins haben (Abb. 3.7).

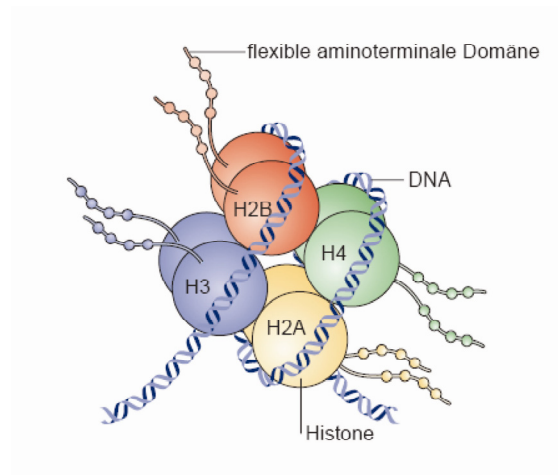


Abbildung 3.7 Aufbau eines Nukleosoms aus dem Kernhiston, um das sich die DNA-Helix linksgängig wickelt. Der Aminoterminus ragt aus dem Nukleosom heraus.^[22]

Zu diesen Modifikationen gehören neben der Acetylierung spezifischer Lysinseitenketten durch Histon-Acetyltransferasen (HATs) auch die Methylierung von Lysin- und Argininresten durch Histon-Methyltransferasen (HMTs) sowie die Phosphorylierung von Serinresten durch Histon-Kinasen (HKs). Daneben wurden die Anheftung von Ubiquitin- und SUMO-Einheiten (*small ubiquitin-related modifier*) sowie von Poly(ADP-Ribose)-Einheiten (PAR-Einheiten) als weitere Modifikationsmöglichkeit beschrieben.^[23-25] Einen Überblick über einige wichtige posttranslationale Histonmodifikationen und deren Auswirkungen gibt Tabelle 3.1.

Tabelle 3.1 Beispiele einiger posttranslationaler Histonmodifikationen (Histon PTM) und deren Einfluss auf die Transkription der beteiligten Gene.^[26]

Histon PTM	Relevante Stelle	Auswirkung auf die Transkription
Lysinacetylierung	H3K(9, 14, 18, 56) H4K(5, 8, 13, 16) H2A, H2B	Aktivierung
Serin/Threonin-Phosphorylierung	H3(3, 10, 28) H2A, H2B	Aktivierung
Argininmethylierung	H3R(17, 23) H4R3	Aktivierung
Lysinmethylierung	H3K(4, 36, 79) H3K(9, 27), H4K20	Aktivierung Repression
Lysinubiquitinylierung	H2B120 H2A119	Aktivierung Repression
Lysinsumoylierung	H2B(6, 7), H2A126	Repression

Auch die funktionell zugehörigen und zur Einstellung eines bestimmten Modifikationsgrades notwendigen Histon-Deacetylasen (HDACs), Histon-Demethylasen (HDMs), Phosphatasen (PPs), Ubiquitin-Hydrolasen (UBPs) und Poly(ADP-Ribose)-Glycohydrolasen (PARGs) wurden bereits identifiziert.^[27-31]

Grundsätzlich kommt das Chromatin in zwei verschiedenen Formen vor. Dabei handelt es sich um das aufgelockerte, für Transkriptionsfaktoren gut zugängliche und somit genetisch aktive Euchromatin sowie das dicht gepackte, genetisch stumme Heterochromatin. Für die Regulation der Chromatinstruktur und somit der Genaktivität ist das Zusammenspiel der oben genannten Modifikationen der Histone verantwortlich.

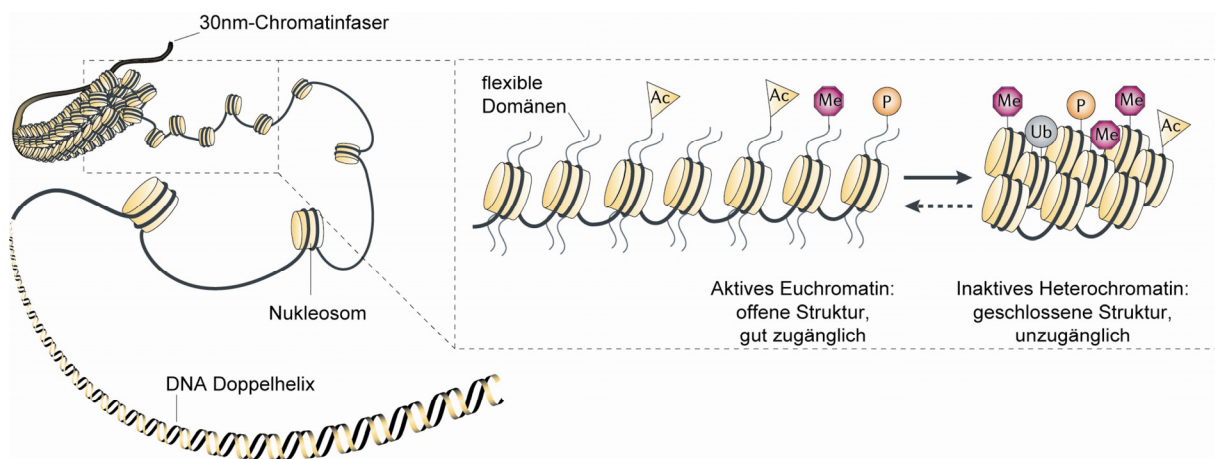


Abbildung 3.8 Der Histoncode. Die aminoterminalen Enden der Histone können posttranslational modifiziert werden und beeinflussen somit die Struktur des Chromatins. (Ac = acetyliert, Me = methyliert, P = phosphoryliert und Ub = ubiquitinyliert).^[32]

Über die N-terminalen Peptidketten der Histone können die einzelnen Nukleosome mit ihren Nachbarn interagieren und so den Übergang von der einfachen *beads-on-a-string*-Struktur mit 10 nm Durchmesser zur 30 nm Chromatinfaser und eventuell zu noch höher geordneten Überstrukturen bewirken. Ausschlaggebend hierfür ist die Wechselwirkung positiv geladener Lysinseitenketten in den flexiblen nukleosomalen Domänen mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrat der umgebenden DNA. Auf Grund der Anziehungskräfte der entgegengesetzten Ladungen verdichten sich die Strukturen und das Chromatin „kondensiert“. Durch Acetylierung der Lysinreste verschwindet die positive Ladung und schwächt somit die Histon-DNA-

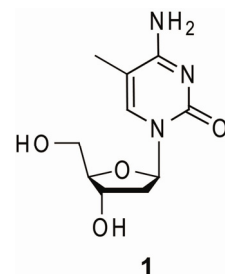
Wechselwirkung, was die Ausbildung des locker gepackten Euchromatins zur Folge hat. Durch die Methylierung von Lysin- und Argininresten wird die positive Ladung über die Änderung des pKa-Wertes beeinflusst. Bei der Phosphorylierung von Serinseitenketten werden hingegen negative Ladungen eingeführt. Je nach Kombination der Modifikationen ergeben sich unterschiedliche Konsequenzen für die Chromatinstruktur und die Aktivität des betroffenen Gens, so dass man von einem regelrechten *Histoncode* sprechen kann (Abb. 3.8).^[33]

Die histonmodifizierenden Enzyme werden durch spezielle Faktoren an die Promotoren rekrutiert. Damit letztere aber überhaupt an diese DNA-Bereiche binden können, sind sogenannte *chromatin remodeling* Komplexe vonnöten, die die dichtgepackte DNA vorher auflockern. Dies geschieht durch Bildung von DNA-Schleifen oder „Verschieben“ der Nukleosomen. Der Vorgang hat allerdings nichts mit der Bildung von Euchromatin zu tun und darf mit diesem Vorgang und den daran beteiligten Faktoren nicht verwechselt werden.

Zusätzlich zu ihrem Einfluss auf die Struktur des Chromatins können die erwähnten Histonmodifikationen aber auch Enzyme und Enzymkomplexe rekrutieren, die an Prozessen wie der Transkription, Replikation sowie der DNA-Methylierung beteiligt sind.^[27]

3.3 DNA-Methylierung

Im Jahr 1948 entdeckte *Hotchkiss* mit 5-Methyl-2'-desoxycytidin (dC^{M} , **1**) die bis dahin einzige kovalente DNA-Modifikation in Eukaryoten, die nicht durch chemische Alkylierung oder oxidative Schädigung der DNA entstanden ist.^[34] Als „fünfte Base“ ist sie für eine große Bandbreite genetischer Regulationen verantwortlich. Dazu gehören so wichtige biologische und entwicklungsspezifische Prozesse wie die genomische Prägung,^[35, 36] die stabile Repression von Genen auf dem inaktiven X-Chromosom,^[37, 38] die Inaktivierung von Fremd-DNA, repetitiven Elementen (Satelliten DNA, LINE/SINE) sowie Retroelementen und Transposons,^[39, 40] die Kontrolle der Länge der Telomere^[41] und die Regulation zell- oder gewebsspezifischer Genexpression (siehe Kapitel 3.2).^[42-44] Außerdem ist die DNA-Methylierung maßgeblich an der Entstehung von genetisch bedingten Krankheiten sowie Krebs beteiligt (siehe Kapitel 3.4.1).^[19, 45-48]



Neben der Methylierung der C5-Position von Cytosin (Dcm Methylierung) können in Prokaryoten außerdem die N4-Position in Cytosin und die N6-Position in Adenin (Dam Methylierung) methyliert werden. Hier ist die DNA-Methylierung u. a. in Restriktions-Modifikations-Schutzsysteme eingebunden, die zur Erkennung und Abwehr viraler Fremd-DNA dienen. Bestimmte Sequenzen der Wirts-DNA werden dabei methyliert und so vor dem Verdau durch zelleigene, methylierungssensitive Restriktionsenzyme geschützt, während unmethylierte Fremd-DNA erkannt und abgebaut wird.^[49-53]

Das Genom von Eukaryoten ist nicht einheitlich methyliert. Es enthält methylierte Regionen, die von nicht-methylierten Domänen durchsetzt sind. Dabei ist die Methylierung an der C5-Position von Cytosin im humanen Genom ausschließlich in CpG-Dinukleotidsequenzen zu finden. Im Laufe der Evolution verschwanden die CpG-Dinukleotide allmählich aus dem Genom höherer Eukaryoten, so dass dieses nur noch 5–10 % der CpG-Folgen enthält, die man aus statistischen Gründen erwarten würde. Von den übriggebliebenen CpG-Motiven enthalten ca. 70–80 % methylierte Cytosine. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass methylierte Cytosine wesentlich leichter hydrolytisch deaminiert werden können als unmethylierte Cytosine. Als Folge entstehen T:G Fehlpaarungen, die nach erneuter Replikation der DNA zu T:A Mutationen führen, sofern sie nicht zuvor durch entsprechende Enzyme repariert werden.^[54, 55]

Im Gegensatz zum restlichen Genom gibt es aber auch Bereiche in der menschlichen DNA, in denen der CG-Gehalt mit 60–70 % den erwarteten Werten entspricht. Diese sogenannten *CpG-Inseln* sind DNA-Sequenzen mit 500–5000 bp Länge und bilden rund 1–6 % der menschlichen DNA. Sie kommen in den Promotorregionen von mehr als 70 % aller Gene vor und liegen in den meisten Fällen unmethyliert vor, weswegen sie auch die Evolution „überleben“ konnten.^[44, 56-58]

In der Regel sind methylierte Promotoren mit einem inaktiven Expressionsstatus des zugehörigen Gens verbunden, wohingegen in den Promotorregionen aktiver Gene die CpG-Sequenzen nicht oder nur geringfügig methyliert sind. Insgesamt liegen etwa 3–8 % aller Cytosine im Genom methyliert vor.^[45, 51, 59]

3.3.1 DNA-Methyltransferasen

3.3.1.1 Einteilung

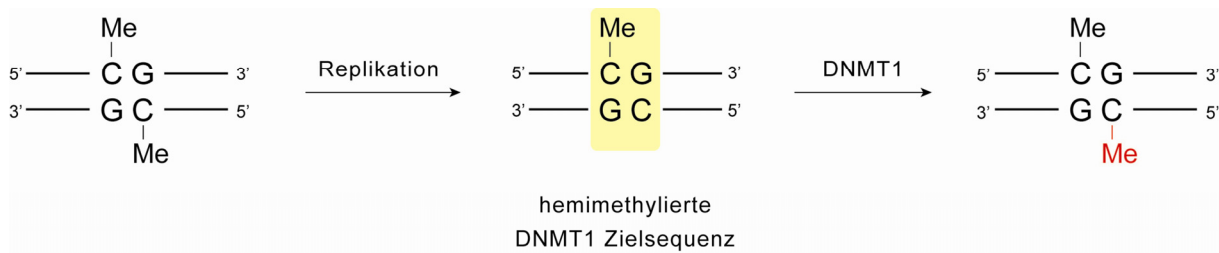
Die verantwortlichen Enzyme für die Methylierung von Cytosinresten in der DNA sind die sogenannten **DNA-Methyltransferasen (DNMTs)**. In den menschlichen Zellen konnten fünf Gene identifiziert werden, die für DNMTs kodieren: DNMT1, 2, 3A, 3B und 3L. Diese können hinsichtlich ihrer Funktion in drei Kategorien eingeteilt werden: Die *maintenance* Methyltransferase DNMT1, die *de novo* Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3B sowie die DNMT-ähnlichen Proteine DNMT2 und DNMT3L.^[51, 60-63]

Letztere sind zwar Sequenzhomologe der Methyltransferase-Familie, besitzen aber keine DNA-Methyltransferaseaktivität *in vitro*. DNMT3L fungiert als Regulator und ist zusammen mit DNMT3A und DNMT3B an der *de novo* Methylierung während der Keimzellentwicklung beteiligt. Es konnte festgestellt werden, dass DNMT3L unmethylierte H3K4 Reste erkennt und durch Rekrutierung von DNMT3A und DNMT3B die Methylierung der DNA einleitet. Das macht sie zu einem direkten Bindeglied zwischen DNA-Methylierung und Histoncode.^[64-68]

Über die Funktion von DNMT2 ist noch sehr wenig bekannt. *Bestor et al.* fanden heraus, dass DNMT2 für die Übertragung einer Methylgruppe auf die C5-Position des Cytosin-38 in der Anticodonschleife der Asparaginsäure-tRNA verantwortlich ist und somit RNA-Methyltransferaseaktivität besitzt.^[69, 70]

Die *de novo* Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3B methylieren im Gegensatz zu DNMT1, die eine Präferenz für hemimethylierte DNA zeigt, unmethylierte DNA-Sequenzen. Sie sind maßgeblich an der *de novo* Methylierung und somit der Etablierung neuer epigenetischer Muster im Verlauf der Embryogenese beteiligt. Die Erkennung der Ziel-DNA-Sequenzen erfolgt dabei über DNMT3L und Transkriptionsfaktoren, die sie an die entsprechenden Stellen vermitteln.^[43, 64, 71-76]

Die Hauptaufgabe der DNMT1 ist der Erhalt des Methylierungsmusters (daher auch der Name *maintenance* Methyltransferase) im Rahmen der Replikation der genomischen DNA. Während der Synthese des Tochterstranges methyliert DNMT1 hemimethylierte Sequenzen, da der Zelle nur dC, nicht aber dC^M zum Einbau in die DNA zur Verfügung steht (Schema 3.1).^[77, 78]



Schema 3.1 Nach der Replikation wird das Methylierungsmuster durch die Methylierung der hemimethylierten CpG-Sequenzen durch DNMT1 aufrechterhalten. Die übertragene Methylgruppe ist rot gekennzeichnet.

Während DNMT1 in den G-Phasen des Zellzyklus diffus im Nukleoplasma verteilt vorliegt, ist sie in der S-Phase an den Replikationsgabeln lokalisiert, vermittelt durch das Protein PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*).^[79, 80] Daneben ist DNMT1 auch an bestimmten DNA-Reparaturprozessen beteiligt.^[81, 82]

3.3.1.2 Aufbau der Methyltransferasen

Von den eukaryotischen Methyltransferasen sind außer dem Komplex von DNMT3A und DNMT3L bis jetzt keine Strukturen bekannt.^[64] Allerdings besitzen die Methyltransferasen alle oder einige von zehn teils hochkonservierten Sequenzmotiven (I – X), die sich zum Großteil innerhalb der katalytisch aktiven, C-terminalen Domäne des Proteins befinden. Die Positionen der hochkonservierten Motive I, IV, VI, VIII, IX und X in den eukaryotischen Enzymen sowie in der prokaryotischen Methylase HhaI sind in Abbildung 3.9 gezeigt.^[51, 60, 63, 83] DNMT1 besteht aus 1620 Aminosäuren und ist mit einer molekularen Masse von rund 190 kDa die komplexeste aller bekannten DNA-Methyltransferasen. Sie besteht aus einer N-terminalen und einer C-terminalen Domäne, die über sich wiederholende Glycin-Lysin-Einheiten (*GK repeats*) miteinander verbunden sind. Der C-Terminus beinhaltet alle für die Katalyse wichtigen Motive und ist dem der prokaryotischen Enzyme sehr ähnlich. Den prokaryotischen Methyltransferasen fehlt hingegen der N-Terminus.^[60, 77, 84-86] In der katalytischen Domäne ist Motiv I für die Bindung des Kofaktors SAM (S-Adenosyl-L-methionin **2**; auch AdoMet) zuständig und Motiv IV beinhaltet den aktiven Cysteinrest (Prolin-Cystein-Dipeptid; PC), über den während

der Methylierungsreaktion eine kovalente Bindung zur Zielbase hergestellt wird (siehe Kapitel 3.3.1.3).^[87-89]

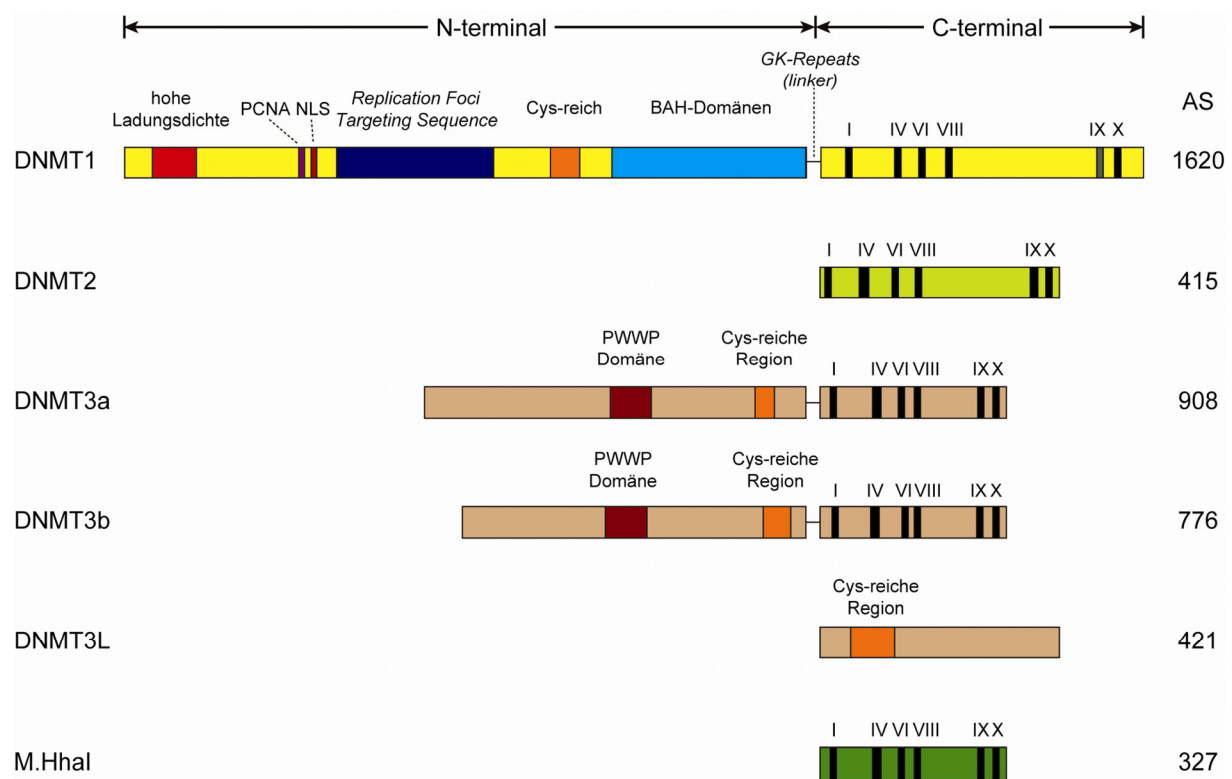


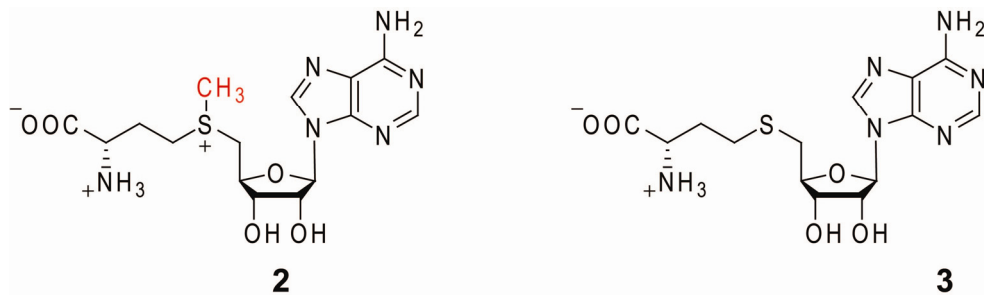
Abbildung 3.9 Schematische Darstellung der Sequenzmotive der eukaryotischen Methyltransferasen sowie der prokaryotischen M.HhaI. Die Abbildung zeigt unter anderem die Positionen der sechs hochkonservierten Sequenzmotive I, IV, VI, VIII, IX und X. Der katalytisch aktive Cysteinrest befindet sich in Motiv IV. Die BAH-Domänen (*bromo-adjacent homology*) von DNMT1 stellen den Kontakt zu weiteren Proteinen her,^[90] die PWWP-Domänen der DNMT3-Familie sind für die Bindung an die DNA zuständig.^[72] NLS = *nuclear localization signal*; AS = Aminosäuren; GK repeats = Abfolge von Glycin-Lysin Einheiten, die C- und N-terminale Domäne miteinander verbinden; PCNA = *proliferating cell nuclear antigen*.

Die größere N-terminale Domäne der DNMT1 besitzt zahlreiche regulatorische Motive. Dazu gehören eine *nuclear localization sequence* (NLS), eine PCNA- sowie eine allosterische DNA-Bindungsstelle, welche eine Zink-Bindedomäne mit acht Cysteinresten enthält, die für die Präferenz des Enzyms für hemimethylierte DNA verantwortlich ist. Desweiteren gibt es noch eine ganze Reihe an Bindungsstellen, die für die komplexen Regulationsprozesse der DNMT1 durch das Zusammenspiel mit verschiedenen Enzymen wie HDAC1, HDAC2, DMAP1 (*Dnmt1 associated protein*; Korepressor), Rb (retinoblastoma tumor suppressor protein; Kontrolle des Zellwachstums), MBPs (*methyl-CpG binding proteins* wie MeCP1 und MeCP2), HP1

(Heterochromatin Protein), SUV39H1, p23 und anderen verantwortlich sind. Diese sind ihrerseits in die verschiedensten zellulären Signaltransduktionswege eingebunden.^[51, 60, 89, 91-100]

3.3.1.3 Methylierungsmechanismus

Die Angaben in der Literatur wie stark DNMT1 hemimethylierte CpG-Sequenzen im Vergleich zu völlig unmethylierten bevorzugt, reichen von einer 7- bis zu einer 40-fachen Präferenz.^[77, 78] Bei der Methylierung wandert das Enzym an der DNA entlang und prozessiert durchschnittlich 50 CpG-Einheiten pro Bindungsvorgang, was in etwa 6000 Basenpaaren entspricht.^[86, 101]



Schema 3.2 *S*-Adenosyl-L-methionin (SAM, **2**) links und *S*-Adenosyl-L-homocystein (AdoHcy, **3**) rechts. Die zu übertragende Methylgruppe ist rot gekennzeichnet.

Alle Methyltransferasen nutzen als Quelle für die zu übertragende Methylgruppe *S*-Adenosyl-L-methionin **2** (SAM), welches als *S*-Adenosyl-L-homocystein (AdoHcy, **3**) aus der Reaktion hervorgeht (Schema 3.2). Im ersten Schritt verschafft sich die Methyltransferase Zugang zu der Zielbase, indem sie diese aus der Doppelhelix herausdreht (*base flipping*, Abb. 3.10).^[102-104]

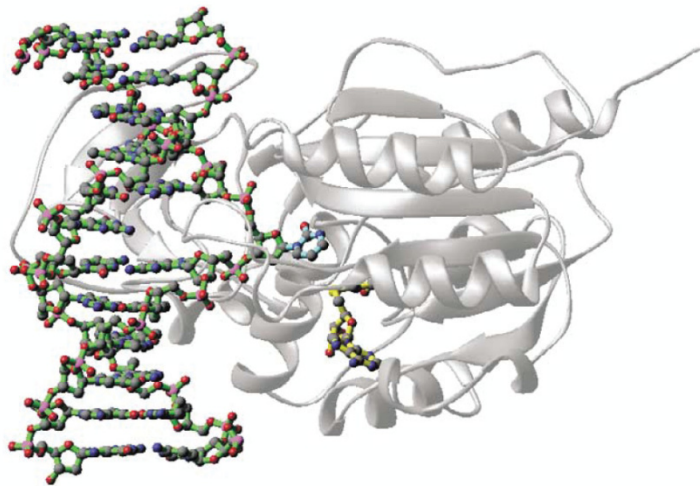
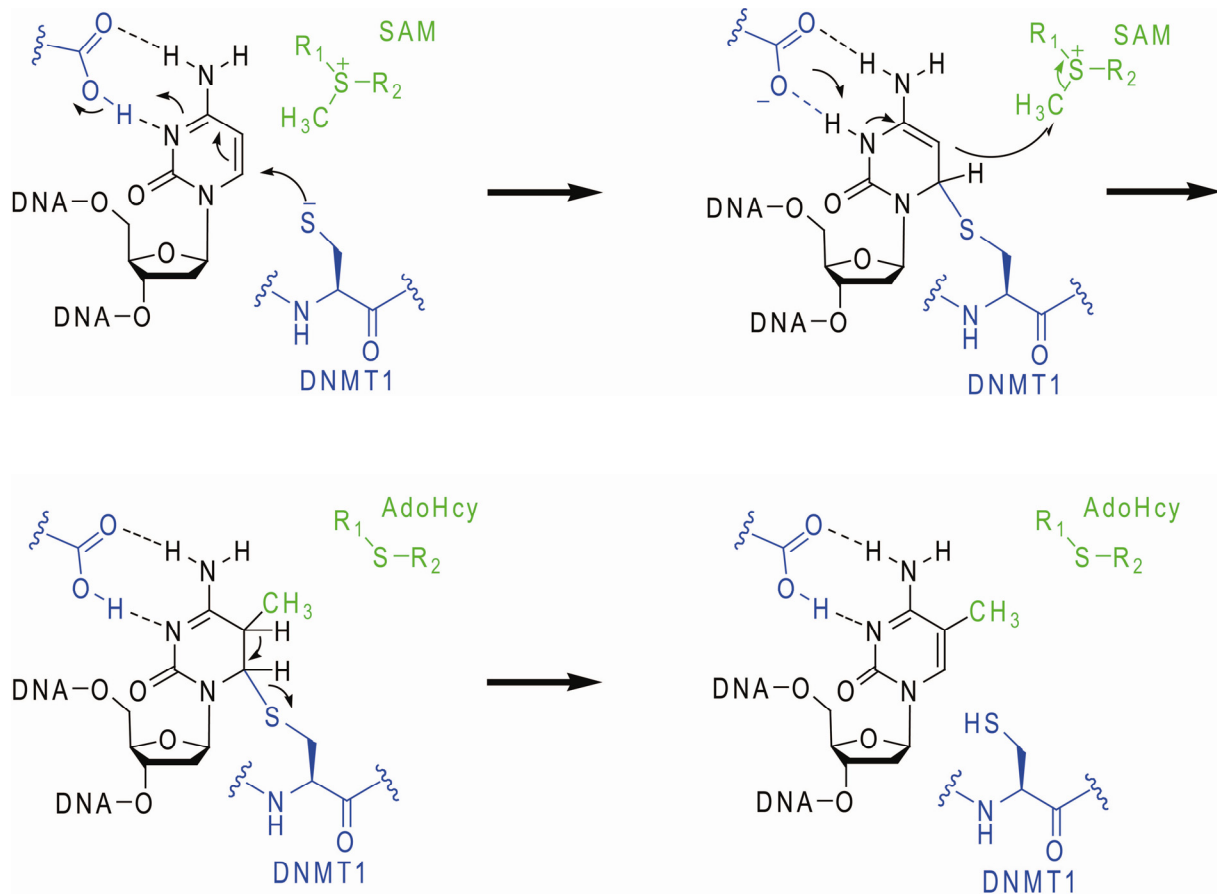


Abbildung 3.10 Kristallstruktur der bakteriellen Methyltransferase M.HhaI mit DNA (13mer) und AdoHcy. Die zu methylierende Base (hier der Inhibitor Desoxyzeburin) wurde aus der Doppelhelix in die aktive Tasche des Enzyms geklappt.^[105]

Die Methylierungsreaktion folgt einer *Michael*-Addition, bei welcher der aktive Cysteinrest der Methylase nukleophil am Kohlenstoff C6 des Pyrimidinrings angreift. Der Angriff wird durch einen enzymatisch vermittelten Protonentransfer auf das Stickstoffatom N3 erleichtert. Es kommt zur Ausbildung einer kovalenten S-C6-Bindung. Im Anschluss erfolgt der nukleophile Angriff des C5-Atoms an der Methylgruppe des Kofaktors SAM. Durch gleichzeitige Eliminierung des Protons am C5 und des gebundenen Enzyms bildet sich die Doppelbindung zwischen C5 und C6 zurück und das Produkt dC^M wird freigesetzt (Schema 3.3).^[51, 106] Der Mechanismus konnte durch Kristallstrukturen von Enzym-DNA-Komplexen bestätigt werden.^[104] Damit in Einklang steht auch die Beobachtung, dass durch Mutation des aktiven Cysteins die Methylase ihre katalytische Aktivität vollständig verliert.^[107-109]



Schema 3.3 Mechanismus der C5-Methylierung von Cytosin durch DNA-Methyltransferasen (hier DNMT1, blau).

3.3.2 DNA-Methylierung, Histonmodifikation und Genexpression

Wie eingangs bereits erwähnt, hat die DNA-Methylierung verschiedene Funktionen, die für die normale Entwicklung einer Zelle lebensnotwendig sind. Um den Rahmen dieser Arbeit nicht zu sprengen, soll im Folgenden nur auf den Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung, Histonmodifikation und Genexpression eingegangen werden.

Vor drei Jahrzehnten wusste man bereits, dass hypomethylierte Bereiche der genomischen DNA (also Bereiche mit geringem dC^M-Gehalt) transkriptionell aktivem Chromatin zugeordnet werden können.^[110] Dieses für Transkriptionsfaktoren gut zugängliche Euchromatin besitzt eine aufgelockerte Struktur und ist genetisch aktiv, d.h. die hier sitzenden Gene können transkribiert werden (vgl. Kapitel 3.2.3). Experimentell zeigt sich dies in Form von DNase I-hypersensitiven Stellen, welche

bis zu tausendmal empfindlicher gegen Restriktion durch DNase I sind als die dicht gepackten Regionen des genetisch inaktiven Heterochromatins.^[13] Während Promotoren von aktiven Genen in der Regel unmethyliert vorliegen, zeichnen sich stillgelegte Gene durch einen hohen Methylierungsgrad der Promotorsequenzen aus. Oft ist ein gegebenes Methylierungsmuster mit einem bestimmten Muster von Histonmodifikationen verknüpft.^[43, 111-114]

Die Methylierung von Promotoren zieht verschiedene Mechanismen nach sich, die sich direkt auf die Initiierung der Transkription und somit auf die Genexpression auswirken (Abb. 3.11).^[54, 71, 112] Die Expression eines Gens kann zum Einen dadurch unterdrückt werden, dass Transkriptionsfaktoren wie E2F, CREB oder AP-2 nicht mehr an diese methylierten Promotorregionen binden können (Abb. 3.11 b)).^[115, 116] Zum Anderen erkennen MBPs (Methyl-CpG-Bindeproteine) wie MeCP1 und MeCP2 solche Sequenzen, binden an diese und können nun ihrerseits mit Proteinkomplexen am Transkriptionsstart interagieren. MeCP1 beispielsweise besitzt neben einer Methyl-CpG-Bindedomäne (MBD) auch eine Transkriptionsrepressor-domäne (TRD), die für die Unterdrückung der Transkription verantwortlich ist (Abb. 3.11 c)).^[43, 54] MeCP2 ist außerdem in der Lage HDACs zu rekrutieren, die wiederum Histone deacetylieren und so zu einer dichteren Packung der DNA in Heterochromatin führen (Abb. 3.11 d)).^[114, 117, 118] Auch die Methylierung von CpG-Einheiten innerhalb von Gensequenzen scheinen eine inhibierende Wirkung auf die Aktivität der RNA Polymerase Pol II zu haben, allerdings ist dieses Thema noch wenig untersucht worden (Abb. 3.11 e)).^[119] Nicht zuletzt kann auch DNMT1 selbst Histondeacetylasen, Histonmethyltransferasen und andere chromatinmodifizierende Enzyme rekrutieren und so zu einer unmittelbaren Verdichtung der Chromatinstruktur beitragen (Abb. 3.11 f)).^[97, 98, 120]

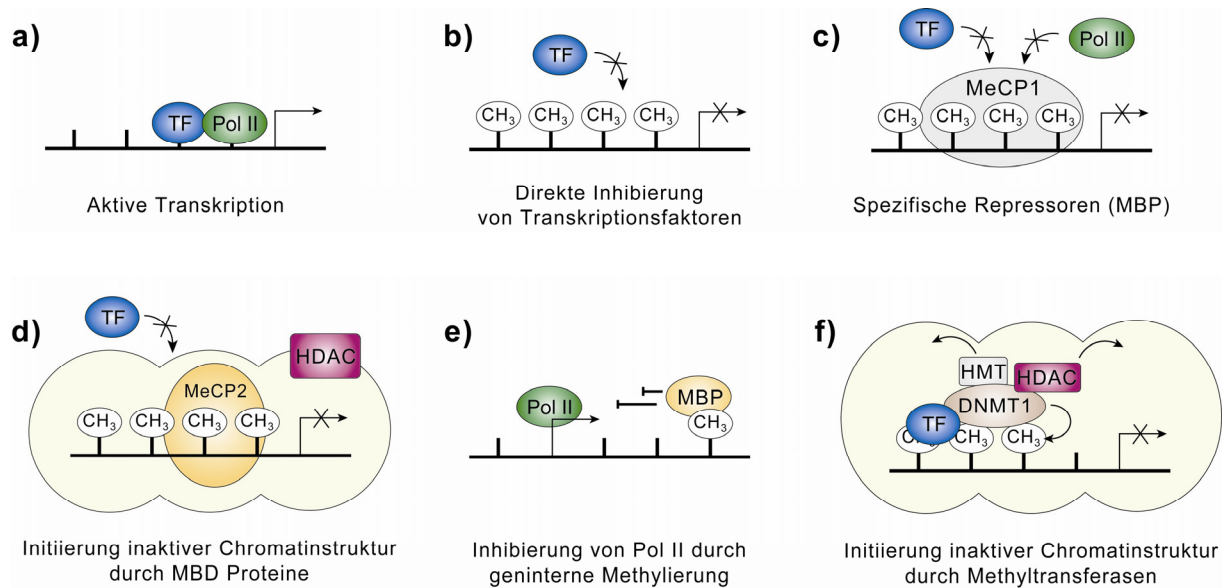


Abbildung 3.11 Auswirkungen der Methylierung von Genpromotoren. **a)** Aktive Transkription bei Abwesenheit von dC^M . **b)** Direkte Inhibition der Bindung von Transkriptionsfaktoren. **c)** MBDs wirken als spezifische Repressoren. **d)** Rekrutierung von Histondeacetylasen durch MBDs und damit verbundene Bildung von Heterochromatin. **e)** Methylierung von dCs innerhalb von Genen inhibiert die Transkription durch Pol II. **f)** DNMT1 rekrutiert histonmodifizierende Proteine. TF = Transkriptionsfaktor; HMT = Histonmethyltransferase; HDAC = Histondeacetylase; MBP = Methyl-CpG-bindende Proteine.

Die beschriebenen Zusammenhänge zwischen DNA-Methylierung, Histonmodifikationen und Chromatinstruktur geben nur einen kleinen Einblick in das hochkomplexe Gebiet der epigenetischen Mechanismen, die für die Regulation der Genexpression zuständig sind. Fest steht, dass ein bestimmtes Methylierungsmuster in Kombination mit spezifischen Histonmodifikationen den Aktivitätsstatus eines Gens determiniert. Unklar ist allerdings, welcher der beiden Mechanismen den jeweils anderen bedingt. Dies muss daher in den meisten Fällen noch untersucht werden.^[33, 43, 113, 114] Anhand des folgenden Beispiels soll das komplizierte Zusammenspiel beider Modifikationssysteme demonstriert werden.

In *N. crassa* konnte eine H3K9-spezifische Methyltransferase (Dim-5) identifiziert werden, welche im ersten Schritt Lysin 9 des Histons 3 dreifach methyliert.^[121, 122] Nun kann HP1 über seine Chromodomäne binden und weitere DNMTs an das Chromatin rekrutieren, die daraufhin die DNA methylieren.^[123, 124] In einer weiteren Phase der Inaktivierung können MBPs, wie MeCP2, die methylierte DNA erkennen und nun HDACs rekrutieren, die Lysinreste deacetylieren und für weitere

Methylierungen zugänglich machen.^[125] MeCP2 kann außerdem auch Histon-Lysin-Methyltransferasen (HKMTs) binden, die H3K9 selektiv methylieren.^[126] Ebenso sind auch Methyltransferasen beschrieben worden, die MB-Domänen zur Erkennung methylierter DNA enthalten, wie z. B. die humane SETDB1. Diese werden mit der H3K9-Methylierung während der DNA-Replikation in Verbindung gebracht.^[127] Erstaunlicherweise können auch DNMTs H3K9-spezifische HKMTs wie Suv39h1 rekrutieren und somit weitere Histon-Methylierungen möglich machen. Diese fortwährenden Zyklen von Histon- und DNA-Methylierung weiten die Geninaktivierung aus (Abb. 3.12).^[27]

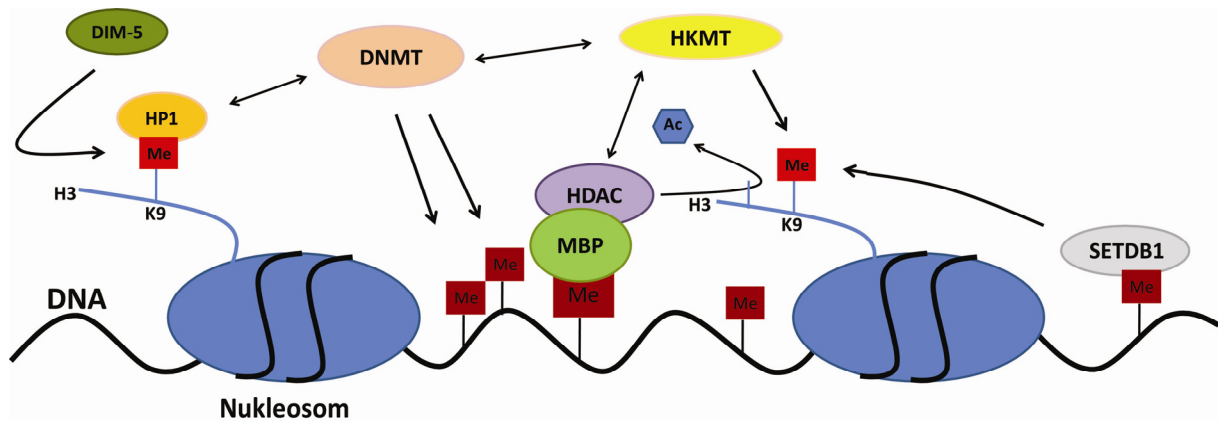


Abbildung 3.12 Das komplexe Zusammenspiel von Histon-Modifikation und DNA-Methylierung: Nach Bindung von HP1 an methyliertes H3K9 werden DNMTs rekrutiert, die daraufhin die DNA methylieren. MBP-Proteine erkennen diese DNA-Methylierung und rekrutieren HDACs, die andere Histonbereiche den Histon-Lysin-Methyltransferasen (HKMTs) mit methylbindenden Domänen (MBD), wie SETDB1 zugänglich machen. Sowohl MBP-Proteine als auch DNMTs können HKMTs rekrutieren.^[27]

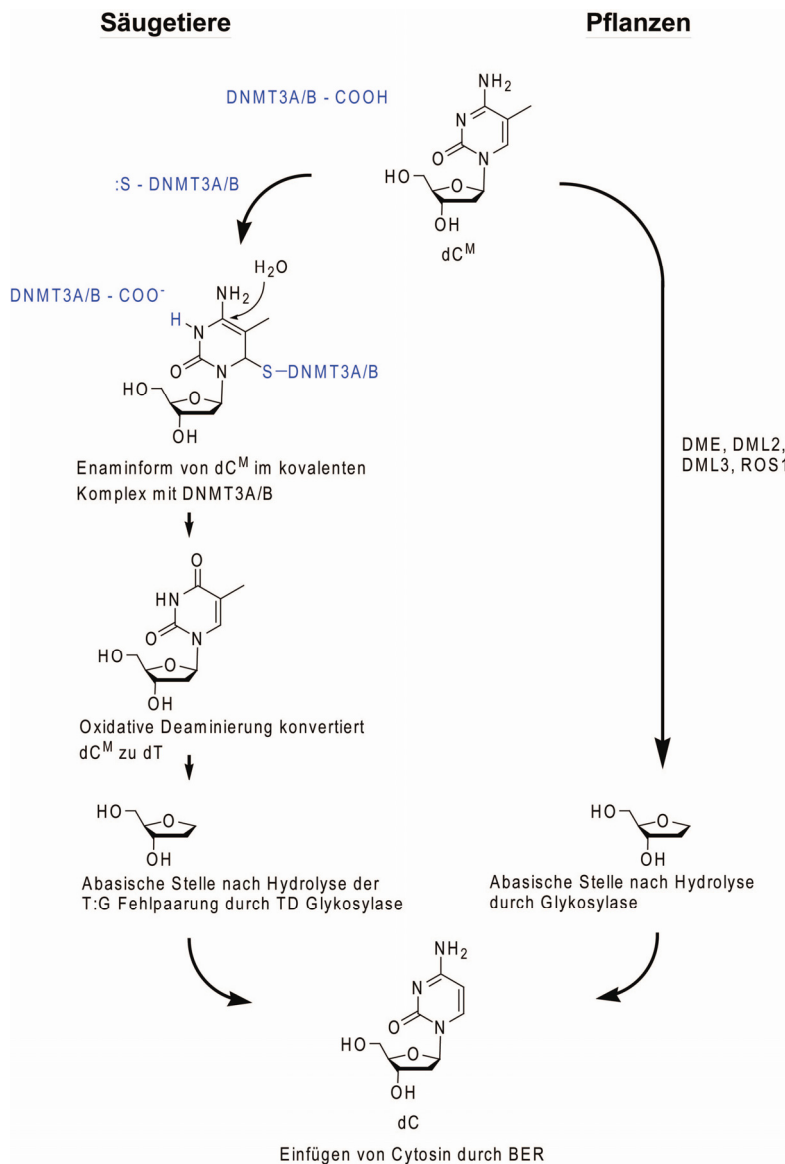
3.3.3 DNA-Demethylierung

Im Gegensatz zu der Vielzahl an Informationen, die über die DNA-Methylierung vorhanden sind, ist über die Demethylierung von dC^M in der DNA noch sehr wenig bekannt. Die meisten biologischen Prozesse, wie die Phosphorylierung oder die Acetylierung, sind reversibel. Auch für die Demethylierung von Histonen konnten bereits spezielle Enzyme, wie die Proteine LSD1, JMJD2 oder PAD4, identifiziert werden.^[128-131]

Innerhalb des Lebenszyklus von Säugetieren gibt es zwei Phasen sogenannter epigenetischer Reprogrammierung, bei der sowohl Histonmodifikationen als auch DNA-Methylierungsmuster zunächst „gelöscht“ und anschließend neu etabliert werden, die Keimzellentwicklung (Gametogenese) und die frühe Embryonalentwicklung.^[74, 132-134] Kurz nach der Befruchtung der Eizelle kommt es zu einer globalen Demethylierungswelle, wobei das paternale Genom sehr schnell und offensichtlich aktiv demethyliert wird, während die Demethylierung des maternalen Genoms passiv erfolgt. Bei dem zuletzt genannten Mechanismus wird die Methylierung neu synthetisierter DNA nach der Replikation entweder durch Inhibition von DNMT1 oder durch ihre Abwesenheit verhindert.^[54] Etwa zum Zeitpunkt des Einnistens der befruchteten Eizelle in die Uteruswand findet eine erneute unspezifische *de novo* Methylierung eines Großteils der CpG-Folgen im Genom statt. Anschließend erfolgt die Feinregulation, bei der die CpG-Inseln in den Promotoren von Haushaltsgenen demethyliert werden. Im Zuge der Differenzierung werden dann die Gene, die zelltypspezifisch zur Expression kommen sollen, ebenfalls durch Demethylierung ihrer Promotoren aktiviert. Es wird angenommen, dass dieser Demethylierungsprozess eher einem aktiven als einem passiven Mechanismus folgt.^[135] Bis jetzt wurden drei Mechanismen beschrieben, wie DNA aktiv demethyliert werden könnte.

Im ersten Fall wurde der direkte Austausch der Methylgruppe durch ein Wasserstoffatom vorgeschlagen. Szyf *et al.* berichteten, dass das Protein MBD2 in der Lage ist, Methylgruppen ohne Hilfe eines Kofaktors (außer Wasser) in Form von freier Formaldehyd schnell und quantitativ zu entfernen.^[100, 136-139] Diese Beobachtung konnte allerdings durch andere Gruppen nicht reproduziert werden und wird daher stark angezweifelt.^[121, 140-142] Auch Mäuse, denen das Enzym MBD2 fehlte, zeigten ein normales Methylierungsmuster.^[143]

Bei den anderen beiden Mechanismen spielen DNA-Reparaturprozesse die Hauptrolle. *Métivier et al.* und *Kangaspeska et al.* berichteten erst kürzlich darüber, dass die Initiierung der Demethylierung durch die beiden Enzyme DNMT3A und DNMT3B eingeleitet wird. Diese sollen die oxidative Deaminierung von dC^M vermitteln, was zu einer T:G Fehlpaarung führt, die wiederum durch die Basenexzisionsreparatur-Maschinerie (*base excision repair*, BER) repariert wird und in einem unmethylierten C:G Paar resultiert.^[144, 145]



Schema 3.4 Vergleich des vorgeschlagenen Demethylierungsmechanismus bei Säugern mit dem etablierten Mechanismus bei Pflanzen. Die oxidative Deaminierung von dC^M führt zu einem T:G *mismatch*, der durch Herausschneiden der Base durch eine Thymin-DNA-Glykosylase (TDG) und anschließende Insertion von Cytosin repariert wird (links). Durch 5-Methylcytosin-Glykosylasen wird bei Pflanzen direkt eine abasische Stelle gebildet (rechts).

In Pflanzen erfolgt die dC^M-Demethylierung hingegen direkt durch die Glykosylasen DME, DML2, DML3 und ROS1 (Schema 3.4).^[146, 147] Neben dem Umweg über die oxidative Deaminierung von 5-Methylcytosin zum Thymin und anschließender Reparatur durch Thymin-DNA-Glykosylasen (TDGs) und BER, konnte bei Menschen auch gezeigt werden, dass Enzyme wie MBD4 5-Methylcytosin-DNA-Glykosylaseaktivität besitzen.^[148, 149]

Des Weiteren wurde noch über die Beteiligung des Enzyms Gadd45a an der aktiven Demethylierung von DNA berichtet, wobei der Mechanismus hier über *nucleotide excision repair* (NER) verläuft. Dabei werden komplette Nukleotide aus der DNA herausgeschnitten und anschließend wieder mit den entsprechenden Nukleotiden aufgefüllt, d.h. 5-Methylcytidin wird also direkt durch Cytidin ersetzt.^[135, 150]

Mit 5-Hydroxymethylcytosin als Zwischenprodukt, ist seit Kurzem ein weiterer Abbauweg von dC^M in der Diskussion.^[151, 152]

Bis jetzt ist der Prozess der aktiven DNA-Demethylierung und somit auch die Steuerungsmöglichkeiten der Expression von Genen über diesen Mechanismus nicht aufgeklärt. Unklar bleibt auch, ob es eine Demethylase gibt, die die C-C-Bindung zwischen Methylgruppe und Cytosinring lösen kann.

3.4 Epigenetik und Krankheitsentstehung

Der nächste große Schritt auf dem Weg zur frühzeitigen Erkennung und Therapie epigenetisch bedingter Krankheiten erfolgt in der Erforschung des *Epigenoms*. Unter dem Epigenom versteht man den Zustand des Chromatins, also der gesamten Erbsubstanz und daran gebundener Proteine, in einem definierten Entwicklungs- oder Aktivierungszustand einer Körperzelle. Ebenso wie das daraus resultierende Muster der RNAs (Transkriptom) ist das Epigenom ein außerordentlich differenzierter, hochcharakteristischer Marker für die Zelle und ihren Gesundheitsstatus.^[153, 154]

Die DNA-Methylierung ist eine wesentliche epigenetische Modifikation des menschlichen Genoms und übernimmt entscheidende Funktionen in zahlreichen zellulären Prozessen, wie der genomischen Prägung, der Inaktivierung des X-Chromosoms, der Kontrolle der Transkription etc. (siehe Kapitel 3.3) ^[51] Wird die Methylierungsmaschinerie gestört und es kommt zur fehlerhaften Methylierung der DNA, hat dies zwangsläufig gravierende Auswirkungen, nicht nur auf die

Funktionsfähigkeit der einzelnen Zelle, sondern häufig auch auf den gesamten Organismus. So konnten im Laufe der letzten Jahre immer mehr Krankheiten mit anomalen Methylierungsmustern oder Fehlern der an der Etablierung und Erkennung von Methylierungsmustern beteiligten Enzyme in Verbindung gebracht werden. Hierzu zählen so unterschiedliche Erkrankungen wie *Rett*-, *Fragile-X*-, *Prader-Willi*-, *Angelman*- und *Beckwith-Wiedemann*-Syndrom sowie *ATR-X* und *ICF*.^[44, 45, 47] Allen gemeinsam sind neuronale Entwicklungsstörungen, die in Form von geistiger Behinderung in Erscheinung treten. Epigenetische Fehlentwicklungen, speziell die DNA-Methylierung, spielen aber insbesondere bei der Krebsentstehung eine entscheidende Rolle.^[46, 100, 155-157]

3.4.1 Epigenetik und Krebs

Lange Zeit wurden allein Mutationen der DNA-Basen, also Defekte im genetischen Code als Auslöser für die Entstehung von Krebs angesehen. Diese Mutationen werden entweder durch äußere Umwelteinflüsse wie Karzinogene, Viren, ionisierende- oder UV-Strahlung ausgelöst, oder entstehen bei fehlerhaften Reparaturprozessen der DNA. Mutationen des Tumorsuppressorgens *p53* beispielsweise finden sich in mehr als 50 % humaner solider Tumoren, wovon wiederum etwa 24 % auf $dC^M \rightarrow T$ Punktmutationen in CpG-Dinukleotiden zurückzuführen sind (vgl. Kapitel 3.3).^[158] Der Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und Krebsentstehung wurde spätestens 1983 offenkundig, als erst *Feinberg* und *Vogelstein*, anschließend *Ehrlich et al.* einen anomal niedrigen 5-Methylcytosin Gehalt von DNA aus humanem Tumorgewebe nachwiesen.^[159-161]

In Krebszellen werden zwei gegensätzliche Beobachtungen in Bezug auf das Methylierungsmuster gemacht: Zum einen sinkt der Gesamtgehalt an 5-Methylcytosin in der genomischen DNA, d.h. es kommt zu einer globalen *Hypomethylierung*, zum anderen werden vor allem in den Promotorregionen bestimmter Gene massiv CpG-Einheiten methyliert, die in gesunden Zellen unmethyliert vorkommen. Lokal kann also eine *Hypermethylierung* der DNA festgestellt werden.^[33, 48] Beide Phänomene sind am Verlust der Kontrolle über den Zellzyklus beteiligt, wozu natürlich auch Wachstum und Apoptose der Zelle gehören (siehe Schema 3.5).^[45, 54] Mittlerweile versucht man, den verschiedenen Tumorarten

bestimmte Störungen des Methylierungsmusters zuzuweisen und diese anhand eines *CpG island methylator phenotype* (CIMP) zu klassifizieren.^[59, 162, 163]

Tabelle 3.2 Beispiele einiger hypermethylierter Gene in Tumorzellen.

Funktion	Gen	Betroffene Organe/Gewebe
Zellzykluskontrolle	Rb1 CDKN2A/p16 INK4B/p15	Netzhaut Lunge, Darm, Brust u. a. Blut
DNA-Reparatur	BRCA1 MGMT MLH1 GSTP1	Brust, Eierstöcke Gehirn, Darm, Lunge, Brust Darm, Magen Prostata, Leber, Brust, Niere u. a.
Metastasierung	CDH1 CDH13 TIMP3 VHL	Brust, Leber, Blut, Magen Lunge, Eierstöcke, Pankreas Gehirn Niere
Transkription	ESR1	Darm, Brust, Lunge, Blut
Apoptose	DAPK1 TMS1	Lymphsystem Brust, Prostata, Eierstöcke

3.4.1.2 Hypomethylierung

Die globale Hypomethylierung von DNA ist die zweite Art von Methylierungsdefekten, die in vielen verschiedenen Krebsarten beobachtet wird und unterschiedliche mechanistische Auswirkungen hat.^[19, 45, 100] Während die mit Krebs assoziierte Hypermethylierung hauptsächlich in nicht-repetitiven DNA-Sequenzen auftritt, sind bei der DNA-Hypomethylierung häufig repetitive Elemente betroffen, was in einer für Krebszellen typischen chromosomalen Instabilität resultiert.^[40, 172, 173] Neben der Aktivierung von Retrotransposons (z. B. LINE-1), die zu deren Transposition oder zu einer fehlerhaften Genregulation durch transkriptionelle Interferenz führen kann, ist auch Satelliten-DNA (z. B. Sat2 oder Satα) betroffen.^[100, 174, 175]

Ein weiterer Zusammenhang zwischen DNA-Hypomethylierung und der Entstehung von Krebs besteht in der Aktivierung von Protoonkogenen.^[176] Bis jetzt gibt es allerdings nur wenige Beispiele, bei denen ein Bezug zwischen krebsbedingter Hypomethylierung von Promotoren und Expression der dazugehörigen Protoonkogene gezeigt werden konnte, wie für *upa* (*urokinase plasminogen activator*),^[177] *c-myc*,^[178] *h-*, *r-* und *k-ras*,^[179-181] *hox11*,^[182] und *bcl-2*.^[183]

3.4.1.3 *Loss of imprinting* (LOI)

Bei der genomischen Prägung (*genomic imprinting*) werden Gene abhängig von ihrer elterlichen Herkunft aktiv oder inaktiv vererbt. Durch spezifische Methylierungsmuster parentaler Allele in Gameten oder Zygoten wird eine differenzierte Expression der beiden Allele eines Gens in den somatischen Zellen der Nachkommenschaft bewirkt. Durch diese epigenetische Prägung ist nur eines der beiden elterlichen Allele aktiv. Unter dem Verlust der genomischen Prägung (*loss of imprinting*) versteht man die fehlerhafte Änderung solcher Merkmale durch Zu- oder Abnahme des Methylierungsmusters der entsprechenden Sequenzen, was mit der Entstehung von Krebs sowie einer Anzahl weiterer Krankheiten verknüpft ist.^[45, 155, 157, 184]

3.4.2 Ursachen der fehlerhaften DNA-Methylierungsmuster

Bis jetzt ist noch sehr wenig über die Zusammenhänge bekannt, die zu den fehlerhaften DNA-Methylierungsmustern führen. Wie bereits in Kapitel 3.3 geschildert, erfolgen die Etablierung und der Erhalt der Methylierungsmuster durch DNMTs. Die Regulationsmechanismen, die die Expression und Aktivität der Methyltransferasen steuern (vgl. auch Kapitel 3.2), müssen einwandfrei funktionieren. Störungen, die die Expression dieser Enzyme beeinflussen, zum Beispiel hervorgerufen durch Viren, wie SV40, EBV oder auch HIV-1, können zur Entstehung pathologischer Veränderungen der epigenetischen Muster führen.^[100, 185-187] Neben Viren wird auch die Beteiligung von geschädigter DNA nahegelegt. Zum Einen können oxidative Schäden innerhalb einer CpG-Sequenz, wie 8-Oxo-dG oder 5-Hydroxymethyl-dC, MBPs am Binden hindern und so den weiteren Verlauf der mit ihnen verbundenen epigenetischen Prozesse unterbrechen.^[188] Zum Anderen zeigen Cytidin-Derivate, wie 5-Chlor-dC und 5-Brom-dC, die in Verbindung mit Entzündungen auftreten, einen gegenteiligen Effekt. Sie imitieren dC^M und führen so zu einer erhöhten Affinität zu den MBPs.^[189] Diese Nukleoside können aber auch direkt mit DNMT1 wechselwirken, da sie von der Methyltransferase als 5-Methyl-dC erkannt werden und so während der Replikation zu der Einführung neuer d(C^MpG)-Einheiten beitragen.^[190] Entsteht umgekehrt durch oxidativen Einfluss aus dem dC^M die 5-Hydroxymethyl-Verbindung, geht die Methylierung an dieser Stelle im Verlauf folgender Replikationen verloren, weil DNMT1 diese Modifikation ignoriert.^[191]

3.5 Methyltransferaseinhibitoren

Wie bereits ausführlich erläutert wurde, sind fehlerhafte DNA-Methylierungsmuster ein generelles Merkmal von Tumorzellen. Die Suche nach bzw. die Entwicklung von Substanzen, mit denen es gelingt die Methylierungsmaschinerie zu manipulieren, ist daher ein attraktives Ziel für therapeutische Maßnahmen zur Bekämpfung von Krebs. Im Blickfeld der Forschung stand dabei bis jetzt die Reaktivierung stillgelegter Tumorsuppressorgene durch Hemmung der für den Erhalt der DNA-Methylierung verantwortlichen Methyltransferase DNMT1. Die Inhibition dieses Enzyms führt zu einer passiven Demethylierung der DNA und somit auch der hypermethylierten Promotorregionen, was die Reexpression der betroffenen Gene zur Folge hat.^[33, 39, 44, 46, 155, 156, 192-198]

Zu den effektivsten und am häufigsten eingesetzten Inhibitoren zählen Nukleosidderivate der Zielbase dC.^[39, 44, 192, 199-202] Nicht vergleichbar mit diesen hochpotenten dC-Analoga ist die schwach hemmende Wirkung von nicht-nukleosidischen kleinen Molekülen wie Procainamid, Koffeinsäure und (-)-Epigallocatechin-3-gallat.^[39, 203-209] Desweiteren konnte die Expression von DNMT1 durch *antisense*-Oligonukleotide^[210-215] und siRNA^[100, 216-218] sowie durch genetische Eingriffe (homologe Rekombination,^[219] induzierbarer *knockout*^[220]) inhibiert werden. Gute Übersichtsartikel zu den bislang bekannten Methyltransferase-Inhibitoren finden sich bei Jones^[199] und Esteller.^[221]

Zu den vier bekanntesten Cytidin-analogen Inhibitoren (Abb. 3.13) gehören 5-Azacytidin (C^N, **4**),^[222-229] 5-Aza-2'-desoxycytidin (Decitabin, dC^N, **5**),^[100, 227, 229-235] 1-Ribofuranosyl-2(1*H*)-pyrimidon (Zebularin, **6**)^[105, 193, 236-239] und 5-Fluor-2'-desoxycytidin (dC^F, **7**).^[102, 106, 240-244]

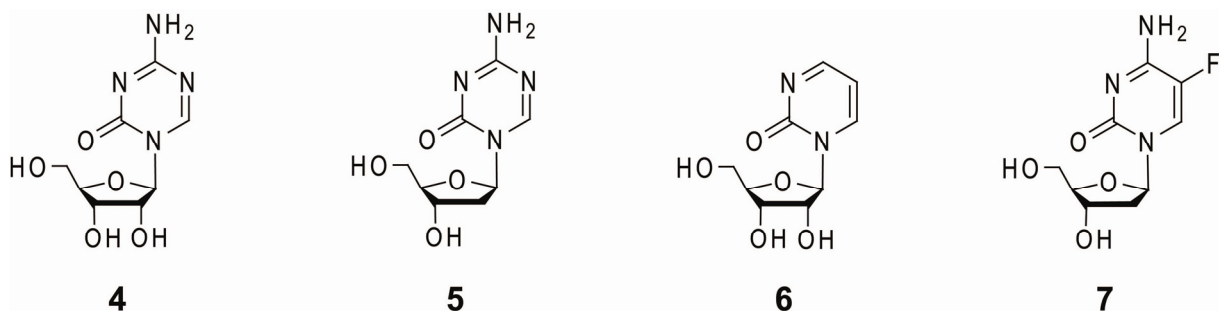
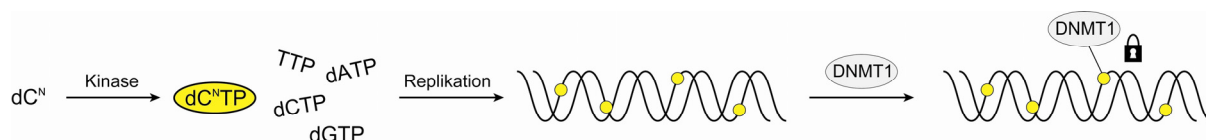


Abbildung 3.13 Strukturformeln der vier bekanntesten Nukleosidinhibitoren für DNA-Methyltransferasen: 5-Azacytidin (**4**), 5-Aza-2'-desoxycytidin (Decitabin, dC^N, **5**), 1-Ribofuranosyl-2(1*H*)-pyrimidon (Zebularin, **6**) und 5-Fluor-2'-desoxycytidin (**7**, dC^F).

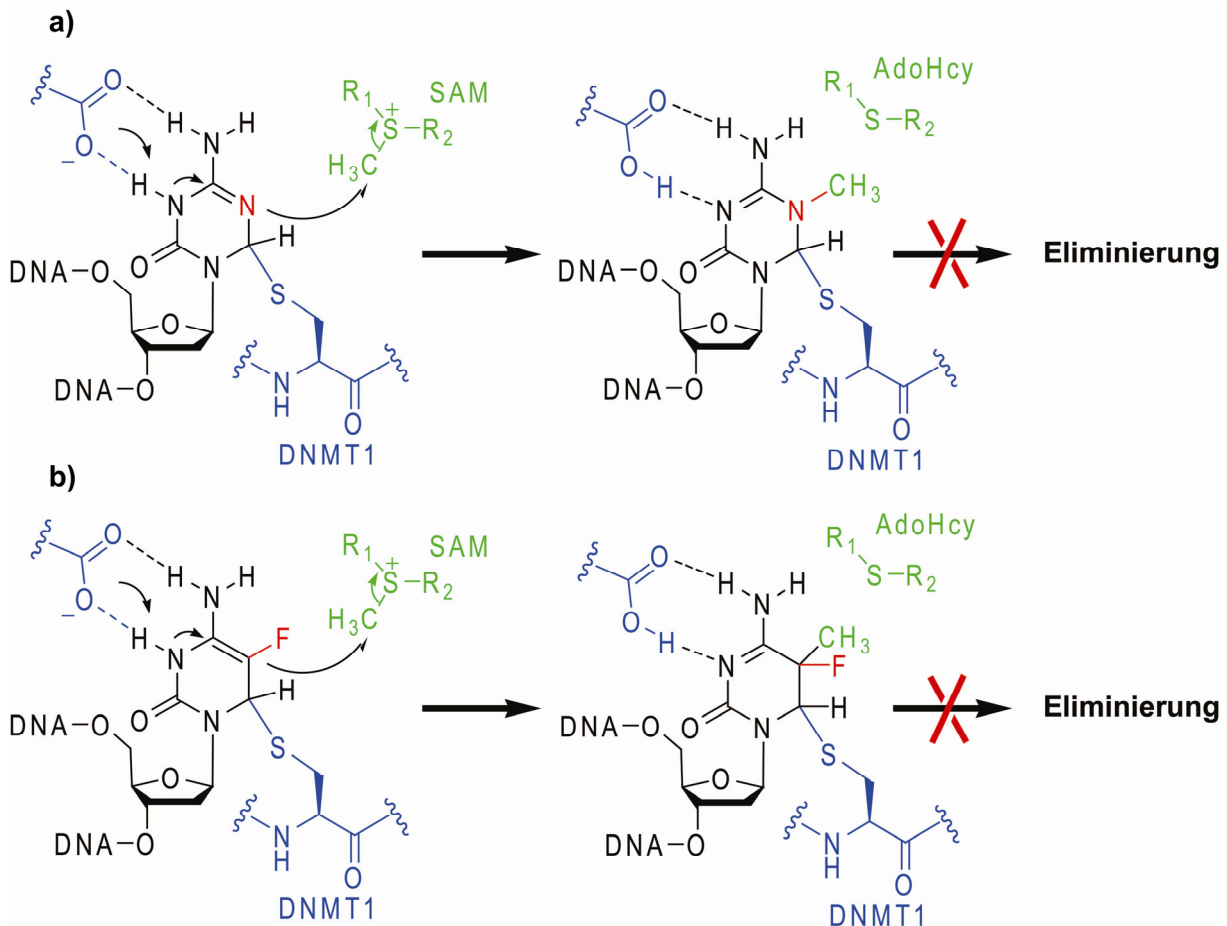
3.5.1 Wirkungsmechanismus der Nukleosidinhibitoren

Nach ihrer Aufnahme in die Zelle werden die Nukleoside durch Desoxycytidinkinase phosphoryliert und die resultierenden aktivierten Monophosphate schnell durch andere Kinasen zu den Triphosphaten umgesetzt.^[245, 246] Diese werden dann im Zuge der Replikation durch Polymerasen in die genomische DNA eingebaut.^[247] Ribonukleoside wie 5-Azacytidin (**4**) müssen allerdings vorher auf der Diphosphatstufe durch Ribonukleotid-Reduktase am C2' zu den entsprechenden DNA-Bausteinen desoxygeniert werden. Da sie aber grundsätzlich auch in RNA eingebaut werden können, ist ihre Wirksamkeit als Methyltransferase-Inhibitoren im Vergleich zu den 2'-Desoxy-Derivaten stark herabgesetzt.^[229, 248] Die so in die genomische DNA integrierten Inhibitoren finden sich nach dem Zufallsprinzip natürlich auch in den CpG-Zielsequenzen der Methyltransferasen. Kommt es nun zu einer Methylierungsreaktion, kann die einmal gebildete kovalente Enzym-DNA-Bindung nicht mehr gebrochen werden, da die Modifikation der Base die notwendige Eliminierung verhindert (Schema 3.6).



Schema 3.6 Wirkungsweise der Nukleosidinhibitoren. Nach der Überführung in die 5'-Triphosphate werden diese im Rahmen der Replikation in die genomische DNA eingebaut. Innerhalb von CpG-Einheiten wird die Methyltransferase während der Methylierungsreaktion kovalent und irreversibel gebunden. dC^NTP = 5-Aza-2'-desoxycytidin-5'-triphosphat (gelbe Kreise).

Im Fall von dC^N und dC^F fehlt schlichtweg das benötigte Wasserstoffatom in Position 5 (Schema 3.7).^[80, 199, 226, 244, 249] Der Inhibierungsmechanismus von Zebularin (**6**), welches noch zwei H-Atome am C5 besitzt, ist hingegen noch unklar.^[250]



Schema 3.7 Reaktionsmechanismus der DNA-Methyltransferase-Inhibierung für **a)** 5-Aza-2'-desoxycytidin und **b)** 5-Fluor-2'-desoxycytidin. Aufgrund des fehlenden H-Atoms in Position 5 kann keine Eliminierung mehr stattfinden und das Enzym bleibt irreversibel kovalent an die DNA gebunden.

Infolge der kovalenten Bindung steht das Enzym nun nicht mehr für weitere Methylierungsreaktionen zur Verfügung, und im Verlauf der folgenden Replikationszyklen nimmt der Methylierungsgrad der DNA kontinuierlich ab (passive Demethylierung).^[44, 196, 226, 233] Die daraus resultierende Demethylierung von CpG-Inseln in den Promotorregionen von Tumorsuppressorgenen, wie p15 oder p16, kann zu deren Reaktivierung und erneuter Expression führen (vgl. Kapitel 3.4.1).^[39, 44, 155, 170, 192, 194, 199, 251, 252]

Mit der Reexpression stillgelegter Gene durch Methyltransferase-Inhibitoren geht auch eine Änderung der assoziierten Histonmodifikationen einher, wobei aber euchromatische Strukturen nicht vollständig wiederhergestellt werden.^[253]

3.5.2 Eigenschaften und Anwendung der Inhibitoren 4, 5 und 7

Die beiden wichtigsten Cytidin-analogen Inhibitoren wurden bereits 1964 von *Sorm* und Mitarbeitern synthetisiert. Zuerst wurde die Ribo-Verbindung 5-Azacytidin (**4**) hergestellt, gefolgt von der entsprechenden 2'-desoxygenierten und weitaus wirkungsvolleren Verbindung Decitabin (**5**).^[224, 254] Kurz danach wurde die Antitumoreigenschaft von **4** entdeckt und schon 1972 befand sich die Substanz in klinischen Studien der Phase II.^[255, 256] Der demethylierende Effekt in Säugetierzellen wurde allerdings erst 1979/80 entdeckt.^[229, 257] 1993 konnte eine positive Wirkung bei der Behandlung des Myelodisplastischen Syndroms festgestellt werden, und **4** kam nach der Zulassung durch die amerikanische *Food and Drug Administration* (FDA) im Jahr 2004 schließlich unter dem Namen *Vidaza* in den Handel.^[222, 258, 259] Auch dC^N (**5**) wurde bereits in den 1970er Jahren in klinischen Studien verwendet. Für die Behandlung von soliden Tumoren scheinen beide Substanzen **4** und **5** nicht besonders geeignet zu sein, allerdings wurden positive Effekte bei Leukämie und anderen hämatologischen Neoplasien festgestellt.^[232, 233, 235, 259-266] Es konnte gezeigt werden, dass **5** auch *in vivo* einen demethylierenden Effekt auf hypermethylierte Genpromotoren hat und wurde nach erfolgreichen klinischen Studien der Phase III unter dem Namen *Dacogen* im Jahr 2006 von der FDA zur Behandlung des Myelodisplastischen Syndroms zugelassen.^[199, 267, 268] Von den drei aktiven humanen Methyltransferasen adressiert **5** dabei fast ausschließlich die *maintenance* Methyltransferase DNMT1.^[211] Ob und in welchem Ausmaß die pharmakologische Aktivität der beiden Substanzen jedoch tatsächlich auf ihre Wechselwirkung mit der DNA-Methylierung und der epigenetisch kontrollierten Genexpression zurückgeführt werden kann, ist allerdings noch weitgehend ungeklärt.^[260]

Ein Nachteil der beiden Inhibitoren **4** und **5** sind die mit ihrer Behandlung verbundenen, gravierenden Nebenwirkungen. So weisen beide Substanzen sowohl eine starke Zytotoxizität als auch eine gewisse Mutagenität auf, was neben dem Einfluss der durch Hydrolyse entstehenden Zersetzungsprodukte nicht zuletzt auf der irreversiblen Bildung des kovalenten DNA-dC^N-Enzym-Komplexes beruht.^[226, 269-271] Desweiteren werden beide Wirkstoffe durch Cytidin-Deaminase deaktiviert und sind in wässriger Lösung instabil, was ihre klinische Anwendung erheblich erschwert.^[199, 259, 272-274] Letzteres liegt in der starken Aktivierung der C6-Position des Heterozyklus – verglichen mit natürlichem Cytosin – bezüglich eines nukleophilen Angriffs

begründet. In den 5-Aza-Derivaten wird die Elektronendichte im Ring durch ein zusätzliches Stickstoffatom, in dC^F durch den Fluorsubstituenten erniedrigt, und im Zebularin fehlt der +M-Effekt der NH_2 -Gruppe.^[108, 250] Die Aktivierung ist derart ausgeprägt, dass selbst Methylasen mit Serin- oder Threonin-Mutationen des katalytisch aktiven Cysteinrestes, die mit unmodifizierten CpG-Motiven nicht mehr reagieren können, hier über ihre OH-Gruppe noch kovalente Bindungen zur Base ausbilden.^[108, 275] Unter physiologischen Bedingungen kann es somit leicht zu einer Zersetzung durch nukleophilen Angriff von Wasser am C6 kommen. Siehe dazu auch Kapitel 5.2.

Von 5-Fluor-2'-desoxycytidin (dC^F , **7**) wusste man bereits in den 1950er Jahren, dass diese Substanz eine wachstumshemmende Wirkung auf Zellen besitzt.^[240, 276] Der für die Zytotoxizität hauptsächlich verantwortliche Effekt ist die Hemmung der Thymidylatsynthase durch den Metaboliten 5-Fluor-2'-desoxyuridinmonophosphat (dU^FMP).^[277] Dieser kann auf zwei Wegen aus **7** entstehen: Erstens durch Deaminierung von **7** zu 5-Fluor-2'-desoxyuridin (dU^F) und anschließender Phosphorylierung und zweitens über Phosphorylierung von **7** durch Desoxycytidinkinase zu 5-Fluor-2'-desoxycytidinmonophosphat (dC^FMP) und anschließender Deaminierung zu dU^FMP .^[202] dC^FMP besitzt ebenfalls einen gewissen hemmenden Effekt auf die Thymidylatsynthase.^[278]

Dieser Metabolismus und die damit verbundenen Auswirkungen drängen die Eigenschaft von dC^F als Methyltransferase-Inhibitor in den Hintergrund. Mit Hilfe kurzer DNA-Doppelstränge, in die innerhalb der entsprechenden Erkennungssequenz für die jeweilige Methyltransferase dC^F eingebaut wurde, konnte gezeigt werden, dass es zur Ausbildung einer irreversiblen, kovalenten Bindung zwischen DNA- dC^F und der Methyltransferase kommt.^[241, 243, 244] Die bakterielle Methylase M.HhaI konnte sogar mit einem solchen Strang kristallisiert werden. Mittels Röntgenstrukturanalyse war es dann möglich, das Herausdrehen der Base aus der DNA-Helix (vgl. Abb. 3.10) sichtbar zu machen und zur Aufklärung des Methylierungsmechanismus beizutragen.^[102, 279]

Um die Wirkung von **7** als Methyltransferaseinhibitor / Antitumormittel zu verstärken, wurde in präklinischen und in ersten klinischen Studien zusätzlich zu dem Nukleosid der Cytidin-Deaminasehemmer Tetrahydrouridin (THU) gegeben, was dazu führte, dass weniger dC^F -Metabolite entstanden, gleichzeitig aber mehr dC^F in das

entsprechende Triphosphat ($dC^F\text{TP}$) umgewandelt und somit vermehrt in die genomische DNA eingebaut wurde.^[202, 242, 280-283]

3.5.3 Grenzen der Behandlung mit Methyltransferaseinhibitoren

Der Einsatz von Methyltransferaseinhibitoren zu therapeutischen Zwecken und die dadurch hervorgerufene Demethylierung des Genoms erfordert eine gewisse Vorsicht.^[156] In Kapitel 3.4.1.2 wurde bereits eingehend auf die Bedeutung der globalen DNA-Hypomethylierung für die Krebsentstehung eingegangen. Daher gleicht die Anwendung dieser Inhibitoren einem Balanceakt, bei dem bereits angeschlagene Tumorzellen durch Demethylierung ihres Genoms und die dadurch hervorgerufene Instabilität kollabieren sollen, gleichzeitig aber gesunde Zellen nicht in Mitleidenschaft gezogen oder gar bestehende Defekte verschärft werden sollen.^[172] Von der durch die Nukleosidinhibitoren hervorgerufene Demethylierung von CpG-Inseln in Promotorsequenzen sind nur wenig Komplikationen zu erwarten, da diese in gesunden Zellen ohnehin zum größten Teil unmethyliert vorliegen. Problematisch könnte die Anwendung dieser künstlichen Substanzen eher für embryonische Gewebe sein, da es im Rahmen der embryonalen Entwicklung zur gezielten Demethylierung bestimmter genomischer Regionen kommt, die einer präzisen Regulation unterworfen sind.^[193] Ebenfalls zu Problemen führen könnte die Reaktivierung stillgelegter X-Chromosome, allerdings wurde dies noch nicht beobachtet.^[194]

Ein allgemeiner Nachteil der bisher bekannten Inhibitoren ist darüber hinaus die Reversibilität des demethylierten Status und die nach einer gewissen Zeit wieder einsetzende Remethylierung nach Beendigung der Therapie.^[100, 236, 284] Um Wirkungsdauer und Effizienz der DNMT-Inhibitoren zu steigern, werden diese daher zusätzlich mit anderen Wirkstoffen wie Histondeacetylase- und Topoisomerase-Inhibitoren kombiniert.^[44, 199, 234, 252, 285-290]

4 Aufgabenstellung und Inhalt der Arbeit

Die vorliegende Arbeit gliedert sich entsprechend der ihr zugrunde liegenden Aufgabenstellung in zwei Themengebiete, die Inhibierung von Methyltransferasen (Kapitel 5) sowie die selektive Modifikation von DNA durch die Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin-Zykloaddition (Kapitel 6).

Im Hauptteil dieser Arbeit war geplant, durch Einbau des bekannten Suizidsubstrats 5-Fluor-2'-desoxycytidin (**7**) in synthetische Oligonukleotide, ein neues Werkzeug zur Inhibition der humanen Methyltransferase DNMT1 in lebenden Zellen zu entwickeln, um die oben genannten Nachteile beim Einsatz von reinen Nukleosiden zu vermeiden und die unerwünschten Nebenwirkungen zu reduzieren oder sogar zu beseitigen. Durch Modifikation des Phosphordiesterückgrats der Oligonukleotide zu Phosphorothioaten sollte die dafür notwendige Stabilität gegenüber der hydrolytischen Zersetzung durch Nukleasen gewährleistet werden. Die inhibitorische Wirkung dieser Konstrukte auf die bakteriellen Methyltransferasen M.HhaI und M.SssI sowie die humane DNMT1 in Abhängigkeit vom Grad der Modifikation der DNA-Stränge wird in Kapitel 5.1 beschrieben.

In Kapitel 5.2 sollte das von A. Gégout synthetisierte carbozyklische Analogon des bekanntesten DNMT1-Inhibitors 5-Aza-2'-desoxycytidin (**5**) auf seine Stabilität in wässriger Lösung getestet werden und seine demethylierenden Eigenschaften in lebenden Zellen sowie dessen Einfluss auf die Zellproliferation bestimmt werden.

Die Synthesen des Cyaninfarbstoffazids Cy3-N₃ und des Oligopeptidazids Arg₈-N₃ sowie der Versuch diese an Alkin-modifizierte DNA über Click-Chemie kovalent zu binden, werden in Kapitel 6.1 dargestellt. Die Experimente wurden im Rahmen eines Projekts mit P. Gramlich zur mehrfachen selektiven Funktionalisierung von DNA durch Click-Chemie durchgeführt.

Das abschließende Forschungsprojekt sollte in Kooperation mit A. Schlossbauer (AK Bein) erarbeitet werden. Es war geplant, mesoporöse kolloidale Silikananopartikel, welche eine Azid-funktionalisierte Oberfläche besitzen, über Click-Chemie mit DNA-Duplexen so zu modifizieren, dass Avidin an ein Biotin des Doppelstranges binden kann, um so als Kappe die Poren des Partikels zu verschließen. Die Öffnung der Poren sollte temperaturgesteuert durch das Aufschmelzen der DNA-Stränge erfolgen, um eingelagerte Moleküle gezielt freizusetzen.

5 Inhibierung von Methyltransferasen

5.1 Einfluss von Phosphorothioatmodifikationen auf die Inhibierung von Methyltransferasen durch kurze DNA-Doppelstränge

5.1.1 Einleitung und Aufgabenstellung

Die Methylierung von Cytosin in genomischer DNA durch DNA-Methyltransferasen spielt eine zentrale Rolle bei der epigenetischen Regulation fundamentaler zellulärer Prozesse.^[25, 43, 51, 81, 112, 113, 140] Kommt es zu Störungen im DNA-Methylierungsmuster, ist dies unmittelbar mit der Entstehung einer Vielzahl menschlicher Krankheiten, insbesondere Krebs, verknüpft. So ist der Gesamtgehalt an 5-Methylcytosin in Tumorzellen erniedrigt, während CpG-Sequenzen in den Promotoren von Tumorsuppressorgenen typischerweise methyliert vorliegen und die entsprechenden Gene daher deaktiviert sind.^[19, 33, 46, 48, 59, 100, 156, 291-293] Durch den Einsatz von Methyltransferase-Inhibitoren wie Decitabin (**5**) ist es möglich, die fehlerhafte Hypermethylierung zumindest temporär durch Demethylierung der DNA zu korrigieren und stillgelegte Tumorsuppressorgene zu reaktivieren.^[39, 44, 170, 194, 195, 199, 233] Mit Hilfe solcher Inhibitoren gelang einerseits der Einstieg in die Therapie epigenetisch begründeter Krankheiten, andererseits bieten sie auch eine Möglichkeit, die noch unzureichend untersuchten molekularen Zusammenhänge und Mechanismen, die der Etablierung sowie der Störung der epigenetischen Markierungen zu Grunde liegen, weiter zu erforschen. Hier besteht weiterhin ein großer Bedarf an biologisch-chemischen Werkzeugen, die es ermöglichen, die zelluläre Methylierungsmaschinerie gezielt zu manipulieren, indem die beteiligten Enzyme spezifisch adressiert werden. So gehört es zu den grundlegenden Strategien der Biochemie, die Expression eines Proteins zunächst herunter zu regulieren, um dann anhand der Auswirkungen in der Zelle Aussagen über dessen Aufgaben machen zu können. Die zu diesem Zweck verwendeten bekannten Methoden, wie RNAi, *Antisense* oder homologe Rekombination, funktionieren jedoch nicht immer in ausreichendem Maße, sind sehr zeit- und arbeitsaufwändig oder bringen anderweitige Probleme mit sich.^[213, 216-218, 220, 294] So führte die genetische Deletion der regulatorischen Domäne von DNMT1 lediglich zu einem verkürzten

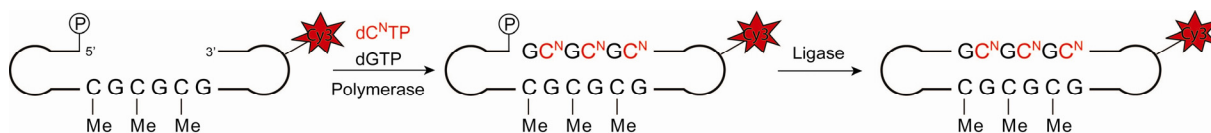
Protein, das aber immer noch in der Lage war, die DNA-Methylierung und damit die Zellproliferation von Tumorzellen zu einem erheblichen Teil aufrechtzuerhalten. Auch RNAi- und *antisense*-Strategien konnten das Enzym nicht komplett ausschalten. Erst durch Kombination von RNAi- und *knockout*-Techniken konnte die DNMT1-Aktivität vollständig unterdrückt werden.^[19, 211, 220, 294, 295] Die Entwicklung neuartiger Methoden zur Inhibierung von DNMT1 könnte deshalb die bestehenden Möglichkeiten auf diesem Gebiet maßgeblich erweitern.

Desweiteren besteht ein enger Zusammenhang zwischen dem DNA-Methylierungsmuster und der Fähigkeit von Stammzellen zu Pluripotenz und Selbsterneuerung.^[25, 296] In verschiedenen Arbeitsgruppen wurde beobachtet, dass modifizierte Nukleoside, wie z. B. **4**, die die DNA-Methylierung inhibieren, einen Einfluss auf die Zell-Differenzierung haben.^[229-231, 257, 297-299] Auf diesem Forschungsgebiet werden große Anstrengungen unternommen, um pluripotente Stammzellen durch Rückdifferenzierung von adulten somatischen Zellen *in vitro* zu gewinnen, wodurch ethische Bedenken gegenüber der Entwicklung von stammzellbasierten Therapien, sowie methodische Probleme umgangen werden können.^[300-302] Da dieser Weg ein möglichst weitgehendes Zurücksetzen („Reprogrammieren“) der epigenetischen Markierungen der ausdifferenzierten Zellen voraussetzt, könnten neue Werkzeuge zur Manipulation der zellulären Methylierungsmechanismen auch hier von großem Interesse sein.^[43, 303, 304]

Der momentan am häufigsten zur Demethylierung von DNA verwendete Nukleosidinhibitor **5** weist, wie bereits ausführlich in Kapitel 3.5.1 erörtert, einige Nachteile auf, darunter seine Instabilität gegenüber Hydrolyse unter physiologischen Bedingungen und die mögliche Zytotoxizität der daraus resultierenden Zersetzungsprodukte (vgl. Kapitel 5.2).^[260, 272-274] Noch wichtiger ist in diesem Zusammenhang sicherlich der irreversibel gebildete Komplex zwischen Enzym und genomischer DNA, was eine fehlerfreie Replikation und Zellteilung unmöglich macht.^[226, 269, 271]

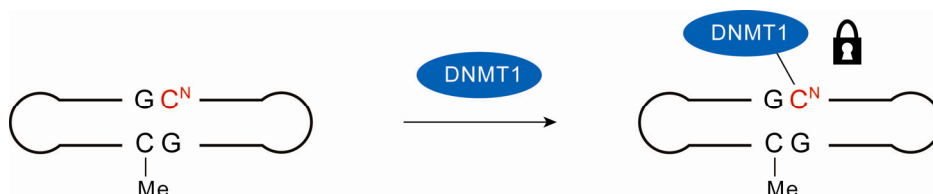
Um diese Nachteile zu umgehen und die Nebenwirkungen, die durch den Einsatz von 5-Aza-2'-desoxycytidin (**5**) entstehen, zu verringern, synthetisierte *D. Kuch* hantelförmige, zirkuläre DNA-Konstrukte (*Dumbbells*), in denen ein dreifaches, hemimethyliertes CpG-Motiv als Erkennungssequenz für die humane Methyltransferase DNMT1 sowie ein Fluoreszenzfarbstoff zur Detektion vorhanden

waren. Gegenüber den methylierten CpG-Einheiten wurde dC durch den Inhibitor dC^N ersetzt. Dies erfolgte durch enzymatischen Einbau des korrespondierenden Triphosphats (dC^NTP). Anschließend wurden die freien Enden ligiert, wie in Schema 5.1 gezeigt.^[305, 306]



Schema 5.1 Synthese der *Dumbbell*-Inhibitor-DNA; P = Phosphat, Cy3 = Cyanin-Fluoreszenzfarbstoff.

Die doppelte Haarnadelstruktur wurde aus dem Grund gewählt, da diese eine erhöhte Resistenz gegenüber Nukleasen besitzt, was für den erfolgreichen Einsatz in Zellen sowie *in vivo* von entscheidender Bedeutung ist.^[307-309] Die *Dumbbells* haben den Vorteil, dass zum Einen die Inhibitorbase dC^N gegenüber hydrolytischer Zersetzung stabilisiert,^[310, 311] und zum Anderen, dass der kovalente Komplex nun zwischen *Dumbbell* und Enzym und nicht mehr zwischen genomischer DNA und Enzym gebildet wird (siehe Schema 5.2).



Schema 5.2 Prinzip der irreversiblen Inhibierung von DNMT1 durch *Dumbbells*, die dC^N tragen.

Mit Hilfe von *electrophoretic mobility shift assays* (EMSAs) konnte *D. Kuch* zeigen, dass im Vergleich zu den Kontrollsträngen (DB5 und DB6) lediglich das aktive Inhibitor-Konstrukt (DB4) eine kovalente Bindung mit der humanen DNMT1 bildet, was durch Aktivitätstests (vgl. Kapitel 5.1.5) bestätigt werden konnte. *L. Schermelleh* aus der Arbeitsgruppe *Leonhardt* konnte außerdem durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie nachweisen, dass nur der dC^N-haltige *Dumbbell* DB4 nach der Transfektion in Zellen (C2C12 Myoblasten) mit DNMT1 an Stellen aktiver Replikation kolokalisiert (Abb. 5.1).

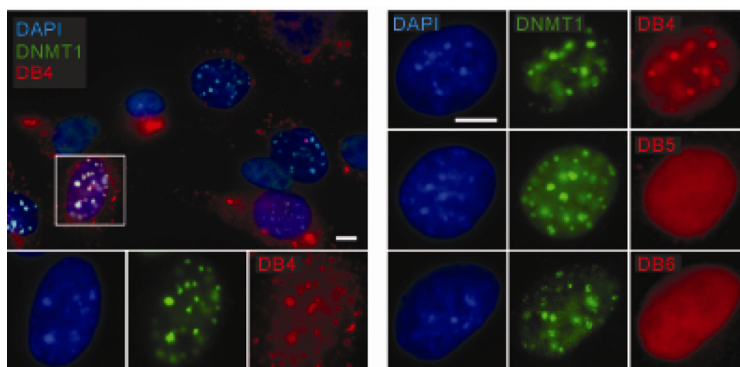


Abbildung 5.1 Kolokalisationsstudien der *Dumbbell*-Konstrukte nach Transfektion in lebende Zellen. Nur der Inhibitor DB4 kolokalisiert mit DNMT1 in C2C12 Mäuse-Myoblasten an Stellen, an denen auch DNA-Replikation stattfindet, während DB5 (hemimethyliert, besitzt aber kein dC^N) und DB6 (besitzt kein dC^N und ist nicht hemimethyliert) diffus im Zellkern verteilt bleiben.

Um die Wirksamkeit von DB4 zu überprüfen, wurde dieser in HCT116-Zellen transfiziert und nachfolgend der genomische Methylierungsgrad bestimmt (vgl. Kapitel 5.1.6). Um eine Senkung des dC^M -Gehalts von 3,9 % auf 2,7 % zu erreichen, mußte der *Dumbbell* mehrfach über zwei Wochen in die Zellen transfiziert werden, bevor aus diesen dann die genomische DNA extrahiert, verdaut und anschließend analysiert wurde. Bis jetzt ist allerdings nicht klar, ob die Senkung des Methylierungslevels tatsächlich das Ergebnis der Inhibition von DNMT1 durch die *Dumbbells* ist, oder ob diese nicht angesichts der relativ langen Behandlungsdauer doch abgebaut und als Folge einzelne 5-Aza-2'-desoxycytidin-Nukleoside in die genomische DNA eingebaut wurden.

Aufbauend auf den Experimenten von *D. Kuch* sollte nun in einem ersten Schritt ein DNA-Inhibitor für die humane Methyltransferase DNMT1 auf Basis der chemischen, manuellen Festphasensynthese entworfen und in ausreichender Menge hergestellt werden. Dieser Ansatz bietet gegenüber der enzymatischen Methode den Vorteil, dass die DNA schneller und in größeren Mengen zugänglich gemacht werden kann. Desweiteren hat man die Möglichkeit, die DNA zu modifizieren, um sie besser vor dem Restriktionsverdau durch Nukleasen schützen zu können. Ein einfacher DNA-Doppelstrang würde bereits im Cytoplasma zersetzt und könnte nicht bis zur Methyltransferase im Zellkern vordringen. Im Rahmen von RNAi- und *Antisense*-Strategien wurden in der Vergangenheit verschiedene Möglichkeiten entwickelt,

Oligonukleotide durch chemische Modifikationen vor einer solchen Degradation zu schützen. Hierzu zählen Phosphorothioat-DNA (PS), 2'-O-Methyl RNA (OMe), 2'-O-Methoxyethyl-RNA (MOE), Peptidnukleinsäuren (PNA), *locked nucleic acids* (LNA), Methylphosphonate und Phosphotriester, um nur einige zu nennen.^[312-320]

Die mit am häufigsten eingesetzten und bereits in klinischen Studien auf ihre Verwendbarkeit getesteten Phosphorothioat-Oligonukleotide erhält man durch den Ersatz eines Sauerstoffatoms der Phosphordiester-Bindungen im DNA-Rückgrat durch ein Schwefelatom.^[321-323] Da der Nukleosidinhibitor in diesem Fall per Festphasensynthese in die DNA eingebaut werden muss, was bei 5-Aza-2'-desoxycytidin nur schwierig und unter großem Arbeitsaufwand zu realisieren wäre, fiel die Wahl auf 5-Fluoro-2'-desoxycytidin.^[324] Dieses Suizidsubstrat wurde schon mehrfach erfolgreich in Form verschiedener Phosphoramidite zur DNA-Synthese verwendet.^[243, 325, 326]

Ein großer Nachteil von Phosphorothioat-modifizierten Oligonukleotiden besteht darin, dass diese ein stark verändertes Bindungsverhalten zeigen und unspezifisch mit verschiedenen Proteinen wechselwirken.^[314, 327] Szyf *et al.* konnten allerdings zeigen, dass hemimethylierte, Phosphorothioat-modifizierte Haarnadeln stabile Komplexe mit DNMT1 ausbilden können.^[328, 329] Aus diesem Grund sollte ein ganzer Satz an unterschiedlich stark Phosphorothioat-modifizierten DNA-Doppelsträngen mit einer hemimethylierten CpG-Erkennungssequenz und dem Suizidsubstrat dC^F, als auch den entsprechenden Referenzsträngen ohne Inhibitor synthetisiert werden. Um eine empfindliche und robuste Detektion zu ermöglichen, sollten diese Stränge außerdem mit einem Cy3-Fluoreszenzlabel am jeweiligen Ende der Duplexe versehen werden, damit diese die Interaktion mit der Methyltransferase möglichst wenig stören können (siehe Tabelle 5.2).

Nach der Synthese und Charakterisierung der Inhibitor-Oligonukleotide sollten zunächst verschiedene *in vitro*-Experimente durchgeführt werden. Neben der Überprüfung der Resistenz gegen Nukleasen sollte die Wirkung der Stränge auf die bakteriellen Methyltransferasen M.SssI und M.HhaI sowie die humane DNMT1 untersucht werden. Zum Einen sollten EMSA-Studien zur Untersuchung des Bindungsverhaltens der einzelnen Oligonukleotide unternommen werden (vgl. Schema 5.2), zum Anderen sollten bereits etablierte Aktivitätsassays genutzt werden, anhand derer die tatsächliche Inhibierung der Methylierungsreaktion kontrolliert werden kann. Bei positivem Verlauf dieser Experimente sollten im nächsten Schritt

die Auswirkungen auf lebende Zellen untersucht werden. Dazu muß gewährleistet werden, dass die Doppelstränge nicht nur in die Zellen, sondern bis in den Zellkern transfiziert werden können, was mit Hilfe von konfokaler Fluoreszenzmikroskopie überprüft werden sollte.

Für den Fall, dass die Aufnahme nicht gelingen würde, sollten die DNA-Konstrukte mit geeigneten Gruppen versehen werden, die die Transfektion in den Zellkern eventuell ermöglichen würden. Es existieren bereits etliche Beispiele, bei denen es gelang, eine verbesserte Aufnahme von modifizierten Oligonukleotiden in Zellen durch Konjugation mit lipophilen Gruppen, Peptiden und anderen Markern zu erzielen.^[330-337] Als potenzielle Kandidaten hierfür waren Cholesterol, welches auch als Phosphoramidit erhältlich ist, und Oktaarginin, das durch Peptid-Festphasensynthese hergestellt und als Azid über Click-Chemie (siehe Kapitel 6.2.2) postsynthetisch an die DNA gebunden werden sollte, vorgesehen. Kurze, kationische Oligopeptide mit Guanidinium-Funktionen (wie Oligoarginine) zeigen eine erhöhte Lokalisation im Zellkern, während sich Oligolysine, welche Aminofunktionen besitzen, vorwiegend im Zytosol anreichern.^[338]

Anschließend war geplant, die Wirkung der Inhibitoren auf den Methylierungsgrad der genomischen DNA von HCT116-Darmkrebszellen zu ermitteln.

5.1.2 Synthese des dC^F-Bausteins 11

Der Einbau von 5-Fluor-2'-desoxycytidin in synthetische Oligonukleotide wurde erstmals von *Osterman et al.* beschrieben. Das verwendete *N*⁴-benzoyl-geschützte dC^F **8** (Bz-dC^F-CEP) war aber unter sauren Bedingungen nicht stabil und somit für die Festphasensynthese ungeeignet. Allerdings gelang es der Gruppe, dC^F in Form seines Triphosphates enzymatisch in DNA zu integrieren.^[241] Entgegen der Aussage von *Osterman* konnten *Cech et al.* das Phosphoramidit **8** über Festphasensynthese ohne Zersetzung in DNA einbauen. Allerdings mussten gewisse Einschränkungen in Bezug auf die verwendeten Schutzgruppen und Entschützungsbedingungen in Kauf genommen werden.^[325]

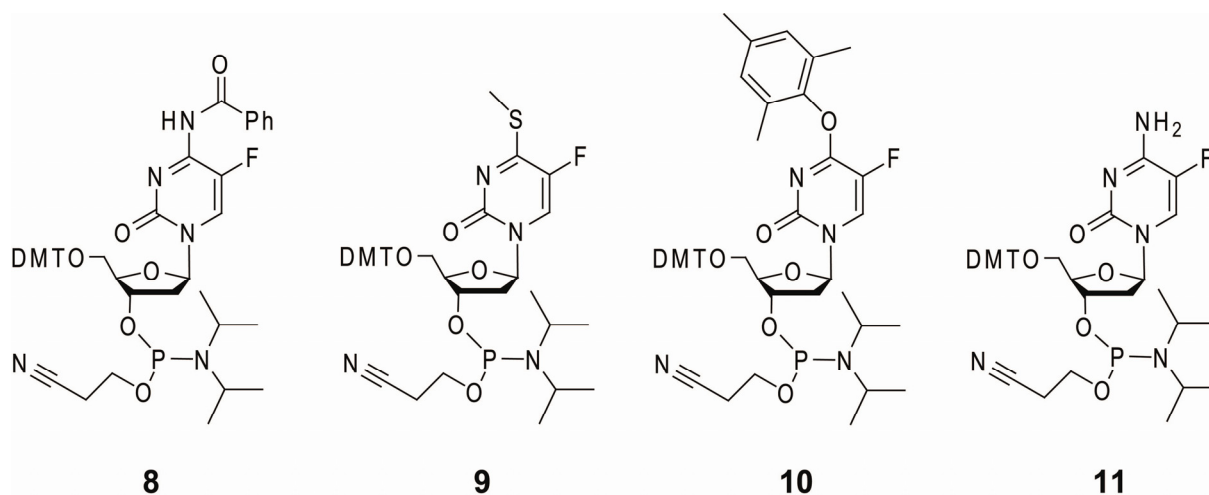
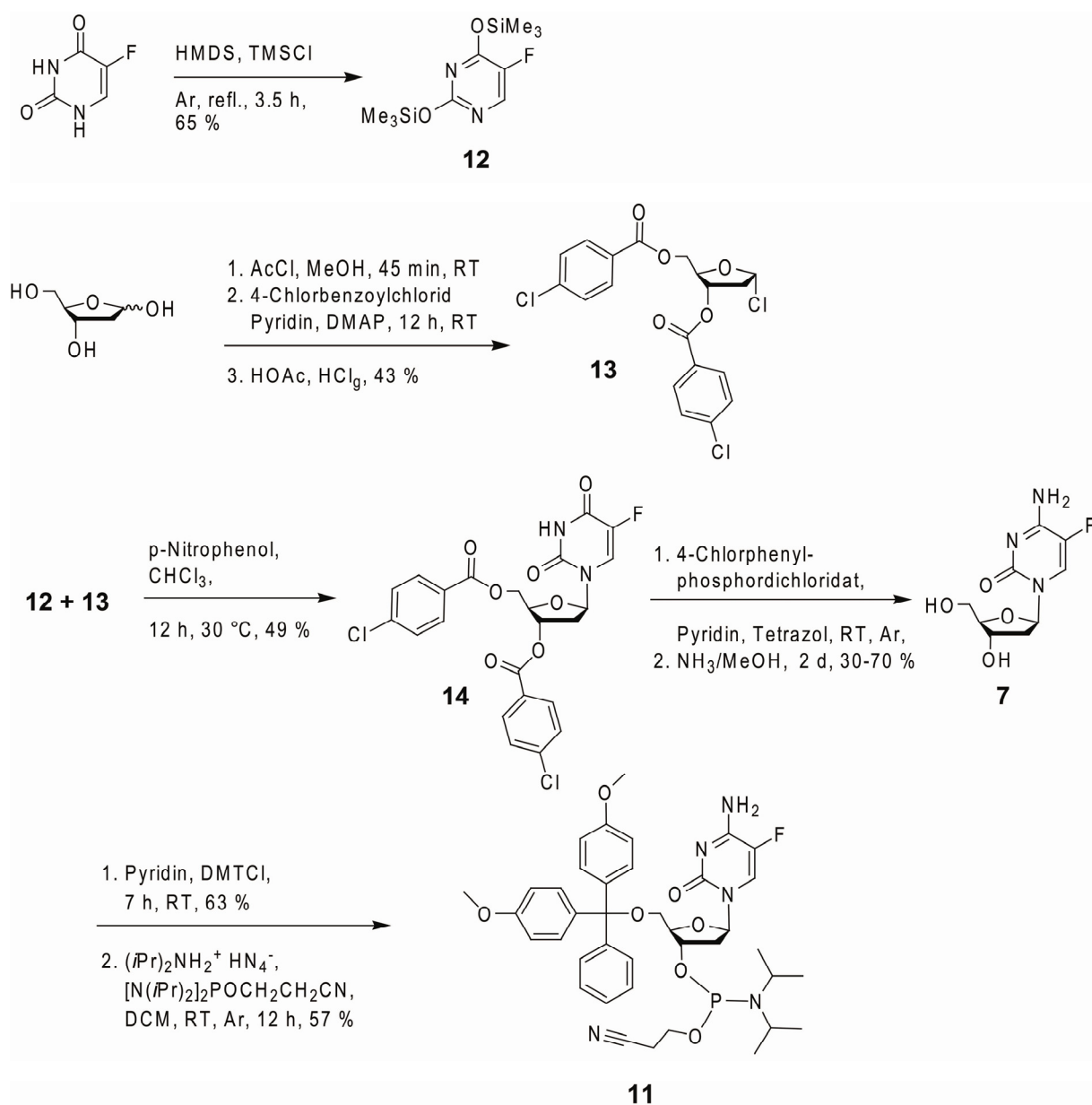


Abbildung 5.2 Phosphoramidite zur Festphasensynthese von dC^F-haltiger DNA: Bz-dC^F-CEP **8**, MeS-dU^F-CEP **9**, TMP- dU^F-CEP **10** und dC^F-CEP **11**.

Als weiteren Vorläufer für dC^F benutzte *Cech* das 5-Fluor-4-methylmercapto-2'-desoxyuridin-Derivat **9** (MeS-dU^F-CEP). Bei der ammoniakalischen Entschützung und Abspaltung von der festen Phase sollte das Nukleotid in dC^F umgewandelt werden. Hier wurde aber zu einem hohen Anteil die Oxidation zu 5-Fluor-2'-desoxyuridin beobachtet, was bei einem mehrfachen Einbau zu untrennbaren Produktgemischen führen würde.^[325]

Zur selben Zeit berichtete *Verdine* von einem ebenfalls konvertiblen Nukleotid (TMP-dU^F-CEP, **10**), welches inzwischen auch von der Firma *Glen Research* vertrieben wird.^[243, 339] In einem ersten Versuch sollte die Methode von *Sufrin* verwendet werden, bei der das dC^F-Phosphoramidit **11** ohne weitere Schutzgruppen direkt in DNA eingebaut werden kann (Abb. 5.2).^[326] Da Amidierungen der exozyklischen Aminogruppe immer nur unvollständig abliefen, ging *Sufrin* davon aus, dass der elektronenziehende Fluorsubstituent die Reaktivität der Aminogruppe so stark herabsetzt, dass deren Schützung überflüssig wird. Die Synthese von **11** erfolgte durch Kombination der Vorschriften von *Aoyama* und *Cech* (Schema 5.3).^[340, 341]



Schema 5.3 Synthese des Phosphoramiditbausteins dC^F-CEP **11**.

Zuerst wurde stereoselektiv das *p*-Chlorbenzoyl-geschützte β -Anomer von 5-Fluor-2'-desoxyuridin **14** durch Reaktion des entsprechenden α -Chlorzuckers **13** mit 5-Fluor-2,4-bis(trimethylsilyloxy)-pyrimidin **12** unter Zusatz von *p*-Nitrophenol in trockenem Chloroform hergestellt. Nach einmaligem Umkristallisieren aus Eisessig erhielt man **14** mit einer Ausbeute von 49 %. Im folgenden Schritt wurde das Uridin- in ein Cytidin-Derivat überführt. Hierzu wurde das Nukleosid **14** in einer Mischung aus abs. Pyridin und 0.45 M Tetrazollösung gelöst und mit *p*-Chlorphenylphosphordichloridat versetzt. Dabei entstand ein 4-Tetrazolo-5-fluorpyrimidin-2-on-Intermediat, welches nach einem Waschgang, Trocknung und Entfernung des Lösungsmittels direkt mit

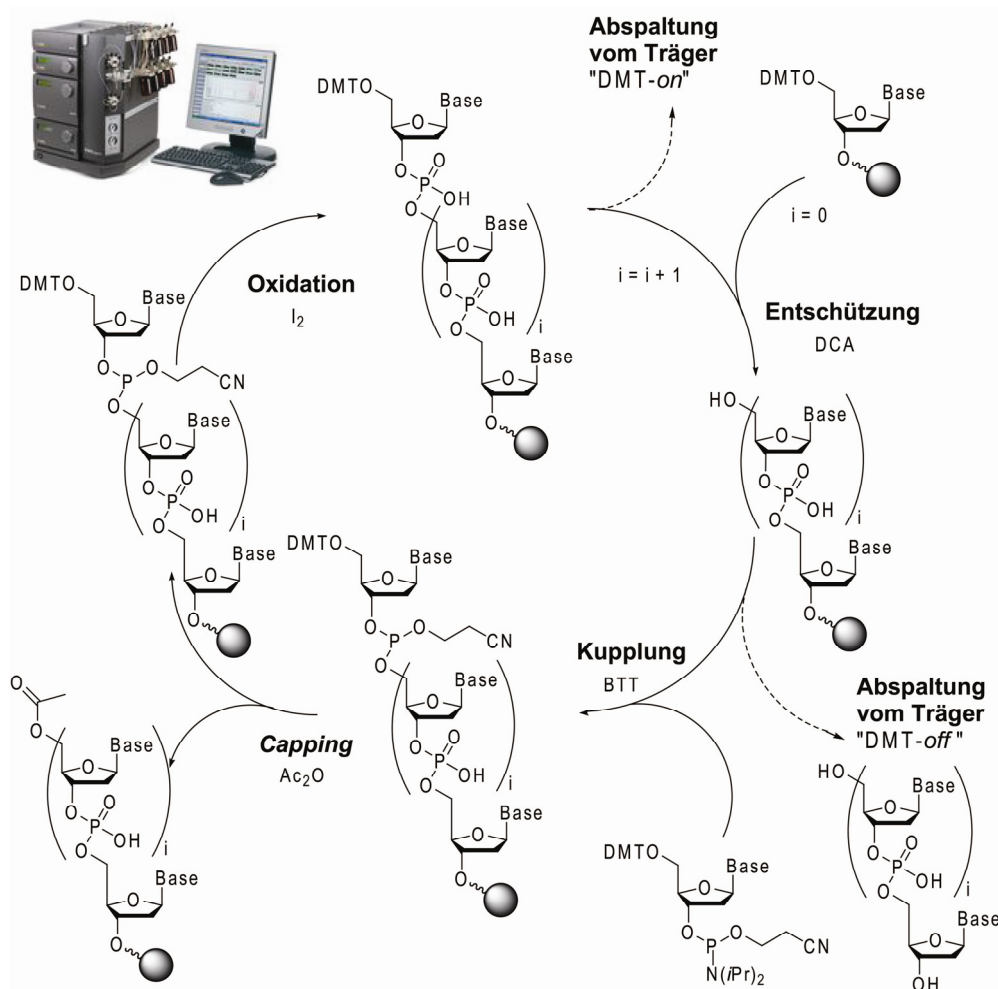
einem Gemisch aus konz. Ammoniak/MeOH 1:1 versetzt wurde und zum freien Nukleosid abreagierte. Die Reaktion lieferte Ausbeuten zwischen 30–70 %, was möglicherweise auf die Rückreaktion eines Teils des Tetrazolderivates mit Wasser zurückzuführen war. Das Vermeiden des Waschschrilles brachte allerdings weder konstantere noch höhere Ausbeuten. Das freie Nukleosid **7** wurde anschließend an seiner 5'-Hydroxylgruppe selektiv mit 4,4'-Dimethoxytritylchlorid geschützt und dann in das Phosphoramidit **11** überführt. Die säulenchromatographische Aufreinigung der letzten beiden Schritte musste mit deaktiviertem *Kieselgel-60* durchgeführt werden, um eine Abspaltung der Schutzgruppe zu verhindern. Der Baustein **11** konnte so in ausreichenden Mengen für die DNA-Festphasensynthese hergestellt werden.

5.1.3 Synthese und Reinigung der DNA-Stränge

Der nächste Schritt zu dC^F-enthaltenden DNA-Duplexen bestand in der DNA-Festphasensynthese unter Verwendung des Monomers **11**. Der in der Literatur angegebene *footprint* des Enzyms DNMT1 variiert zwischen 22 und 30 Basenpaaren.^[86, 342, 343] Allerdings konnten, wie bereits geschildert, sowohl Szyf (12 Basenpaare)^[328] als auch Kuch (16 Basenpaare)^[305] die humane Methyltransferase durch kürzere, doppelsträngige DNA-Inhibitoren gezielt hemmen. Die im Folgenden synthetisierten DNA-Stränge hatten alle eine Länge von 18 Basen, um als adäquates Substrat für DNMT1 sowie die bakteriellen Methylasen M.HhaI und M.SssI dienen zu können. Die Sequenz bestand aus einem dreifachen CpG-Motiv, dessen Cytidine durch dC^F ersetzt wurden und zwei flankierenden Elementen, die sich nahezu vollständig mit den von Kuch verwendeten deckten.^[305] Diese besaßen 5 bzw. 7 Nukleotide und waren so konzipiert, dass sie nicht zueinander komplementär waren. Um außerdem die später folgenden Inhibierungsversuche der Methyltransferasen durch diese Suizidsubstrate detektieren zu können, wurde der Cyaninfarbstoff Cy3 als Cy3-Phosphoramidit (*Fa. Glen Research*) in einem finalen Kupplungsschritt an das 5'-Ende des DNA-Einzelstranges gebunden. Der einzige Unterschied zwischen dem Einbau der natürlichen Nukleotide und den Sonderbasen dC^F sowie Cy3 bestand darin, dass diese anstatt der üblichen 4 min ganze 10 min gekuppelt wurden, um einen möglichst kompletten Einbau zu gewährleisten. Der Gegenstrang besaß keine Fluoreszenzmarkierung und alle Cytidine innerhalb der

Erkennungssequenz wurden durch 5-Methyl-2'-desoxycytidin (**1**) (dC^{M} -Phosphoramidit, *Fa. Glen Research*) ersetzt.

Die DNA-Festphasensynthese wurde im 2 μmol -Maßstab durchgeführt. Es wurden CPG-Träger (*controlled pore glass*, *Fa. Glen Research*) verwendet, an die die erste Base oder Cholesterol, welche das 3'-Ende des Stranges darstellen, bereits gebunden waren. Das Oligomer wurde nun durch aufeinanderfolgende Kupplungen von 3' in 5'-Richtung aufgebaut. Die zu kuppelnden Monomere wurden als 5'-DMT-3'-Phosphoramidite mit den basenspaltbaren *N*-Schutzgruppen Acetyl (Ac), Benzoyl (Bz) oder Isobutyryl (*i*Bu) eingesetzt. Das Thymidinphosphoramidit lag wie das dC^{F} -Phosphoramidit **11** ungeschützt vor. Jeder Syntheszyklus bestand aus vier Teilschritten, die im Folgenden detailliert beschrieben werden (Schema 5.4).



Schema 5.4 Syntheszyklus in der Phosphoramiditchemie.

Zu Beginn wurde die DMT-Schutzgruppe des zuletzt gekuppelten Nukleotids mit Hilfe von Säure abgespaltet (*Entschützung*). Anschließend wurden die nun freien Hydroxylgruppen mit dem Phosphoramidit der nächsten Base unter Verwendung von 5-Benzylthiotetrazol (BTT) als Aktivator gekuppelt (*Kupplung*). Die Kupplungsausbeuten bewegten sich in einem Bereich > 98 %. Die nicht umgesetzten freien 5'-OH Gruppen wurden im nächsten Schritt mit Acetanhydrid verestert, um die Bildung von Fehlsequenzen zu verhindern, was bei der chromatographischen Aufreinigung zu Problemen geführt hätte (*Capping*). Die Oxidation des Phosphits zum Phosphat erfolgte durch Behandlung mit Iodlösung (*Oxidation*). Am Ende einer Synthese wurde das fertige Oligodesoxynukleotid durch Inkubation mit einer Lösung von konzentriertem Ammoniak in Ethanol (3:1) für 24–36 h bei 25 °C von seinen Schutzgruppen befreit und vom Trägermaterial abgespaltet. Die folgenden DNA-Stränge konnten synthetisiert und isoliert werden (Tabelle 5.1).

Tabelle 5.1 Sequenz und Bezeichnung der synthetisierten DNA-Stränge (C^M = 5-Methyl-2'-desoxycytidin; C^F = 5-Fluor-2'-desoxycytidin; Chol = Cholesteryl, Cy3 = Cyaninfarbstoff).

Bezeichnung	Sequenz
S1'	3'- CGAGAGCGC ^F GCTGAGGTT-Cy3 -5'
S2	3'- CGAGAGC ^F GC ^F GC ^F TGAGGTT-Cy3 -5'
S9	3'- Chol-CGAGAGC ^F GC ^F GC ^F TGAGGTT-Cy3 -5'
S4	5'- GCTCTC ^M GC ^M GC ^M GACTCCAA -3'

Die Aufreinigung der Oligonukleotide erfolgte durch *reversed phase*-HPLC. Bei dem Einbau eines dC^F Bausteins reichte eine doppelte präparative Trennung aus, um die DNA in der gewünschten Reinheit zu erhalten (Abb. 5.3).

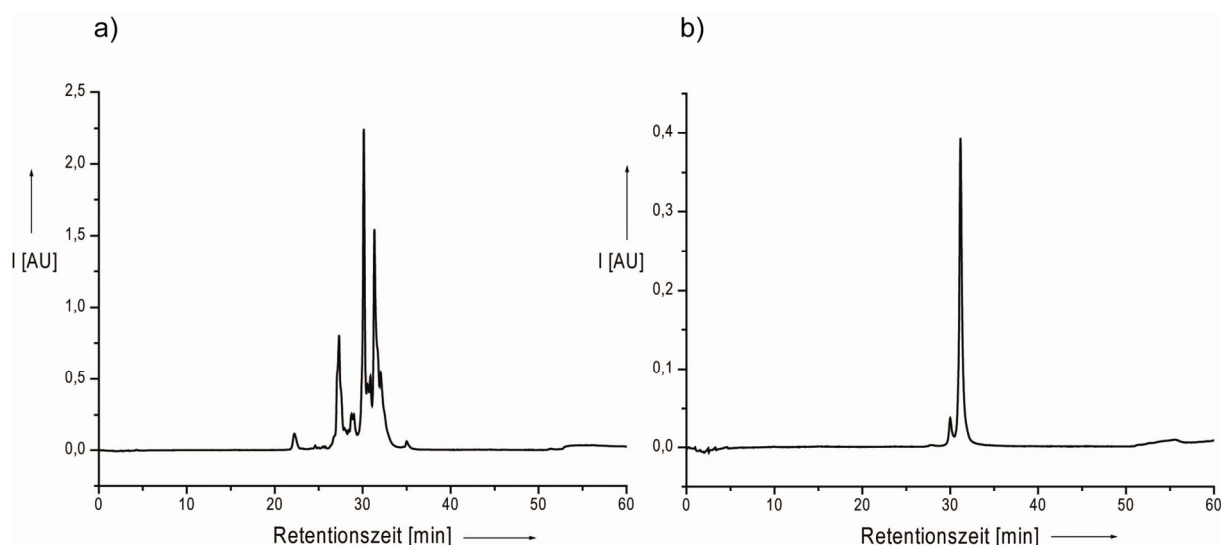


Abbildung 5.3 a) Rohchromatogramm von **S1'** und b) nach einmaliger präparativer Aufreinigung.

Das Rohchromatogramm des dreifachen Einbaus hingegen zeigt, dass der ungeschützte Phosphoramiditbaustein **11** zu unerwünschten Nebenreaktionen führte, was sich durch ein sehr breites unsauberes Signal manifestiert und **11** somit für diese Synthese ungeeignet war (Abb. 5.4 a)). Auch nach doppelter Reinigung und den damit verbundenen hohen Ausbeuteverlusten war keine saubere Trennung möglich (Abb. 5.4 b)). Ohne Probleme hingegen konnte der käufliche TMP-dU^F-CEP-Baustein **10** dreifach eingebaut und die DNA nach zweimaliger präparativer RP-HPLC sauber isoliert werden (Abb. 5.4 c) und d)).

Der Strang **S4** wurde DMT-*on* synthetisiert, was bedeutet, dass die letzte Schutzgruppe vor der Abspaltung vom Träger nicht entfernt wurde. Diese Maßnahme erhöht die Lipophilie der DNA, was zu einer höheren Retentionszeit und damit zu einer leichteren chromatographischen Abtrennung von Abbruchsequenzen führt. Zur Entfernung der Schutzgruppe wurden die Stränge nach der HPLC Reinigung auf eine *Sep-Pak*TM-Kartusche aufgebracht. Durch kurze Behandlung (1–2 min) mit 1.5 % Trifluoressigsäure wurde die DMT-Gruppe entfernt. Um einer Schädigung der DNA (z. B. Depurinierungen) vorzubeugen, wurde sogleich mit HPLC Puffer A neutralisiert und die DNA nach dem Waschen eluiert, aufkonzentriert und einer weiteren RP-HPLC unterworfen.

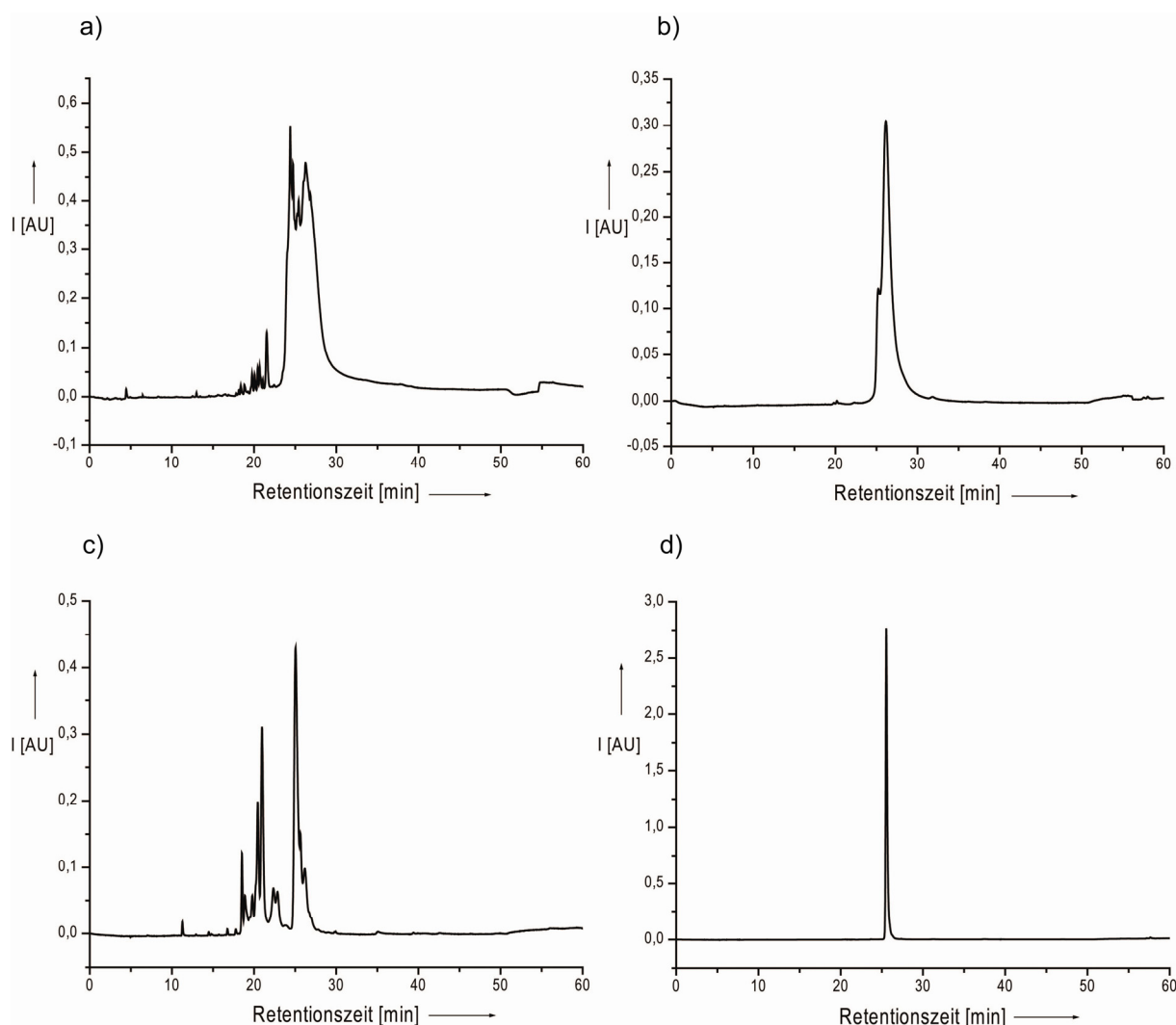


Abbildung 5.4 a) Rohchromatogramm von **S2** nach dreifachem Einbau von ungeschütztem dC^F-Phosphoramidit **11** und b) nach zweimaliger präparativer Aufreinigung. c) Rohchromatogramm von **S2** nach dreifachem Einbau von TMP-dU^F-Phosphoramidit **10** und d) nach zweimaliger präparativer Aufreinigung. Die leicht unterschiedlichen Retentionszeiten wurden durch geringfügige Abweichungen in der Pufferzusammensetzung verursacht.

Auf Grund der doppelten HPLC-Aufreinigung und der entstandenen Nebenprodukte (Verlust des Fluoreszenzfarbstoffs und Cholesterol durch Eliminierung während der basischen Abspaltung) war die Ausbeute an sauberen Oligonukleotiden sehr gering und betrug durchschnittlich 6-10 %. Daher mussten die Stränge mehrfach synthetisiert werden, um alle nachfolgenden Experimente problemlos durchführen zu können. Alle Oligonukleotide, die keine Sonderbasen enthielten oder ein Phosphorothioatrückgrat besaßen, wurden von der *Fa. Metabion* bezogen.

5.1.4 Charakterisierung der DNA-Stränge

Die molekularen Massen der gereinigten Oligonukleotide wurden mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestimmt. Die ermittelten Massen stimmten dabei im Rahmen der geräteeigenen Toleranzgrenzen in allen Fällen mit den berechneten Massen überein. Eine Übersicht über die berechneten und gefundenen Massen befindet sich in Tabelle 5.2. Zur Probenvorbereitung mussten die DNA-Stränge gründlich entsalzt werden (Dialysemembran oder *ZipTipTM*). Unter Verwendung der Matrix HPA-15-Krone-5 (siehe Kapitel 7.1.1) wurden exzellente Massenspektren erhalten, wie in Abbildung 5.5 für den Strang **S2** gezeigt.

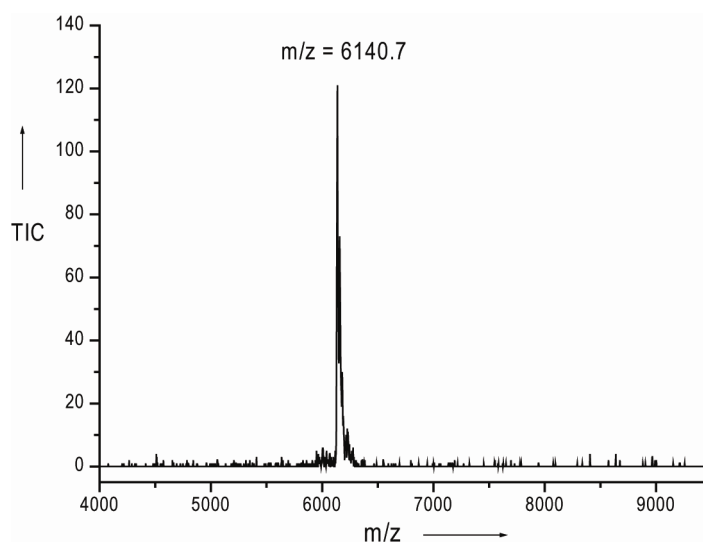


Abbildung 5.5 MALDI-TOF-Massenspektrum des gereinigten Strangs **S2**.

Man erkennt deutlich, dass neben dem Molekülpeak ($M_{\text{ber.}} = 6139.2$, $M_{\text{gef.}} = 6140.7$) keine weiteren Signale detektiert wurden.

Um außerdem feststellen zu können, ob das TMP-dU^F-Nukleotid **10** vollständig zu dC^F konvertiert wurde, wurden die DNA-Stränge einem enzymatischen Totalverdau unterworfen. Dazu wurden die Oligonukleotide durch sukzessive Behandlung mit Nuklease P1, *calf spleen*-Phosphodiesterase, *alkaline calf intestinal*-Phosphatase und *snake venom*-Phosphodiesterase verdaut, sodass am Ende die freien Nukleoside vorlagen. Diese wurden durch ein ESI-LC-MS-Experiment nachgewiesen. Zuerst wurde das Nukleosidgemisch per RP-HPLC aufgetrennt und die einzelnen Komponenten anschließend mit Hilfe eines gekoppelten *Finnigan* FTICR-Massenspektrometers bestimmt. In Abbildung 5.6 sind das UV-Chromatogramm

(260 nm) sowie die Massenspektren der relevanten Signale eines solchen Experiments für den Strang **S2**, sowie die Masse von dC^M des Strangs **S4** gezeigt.

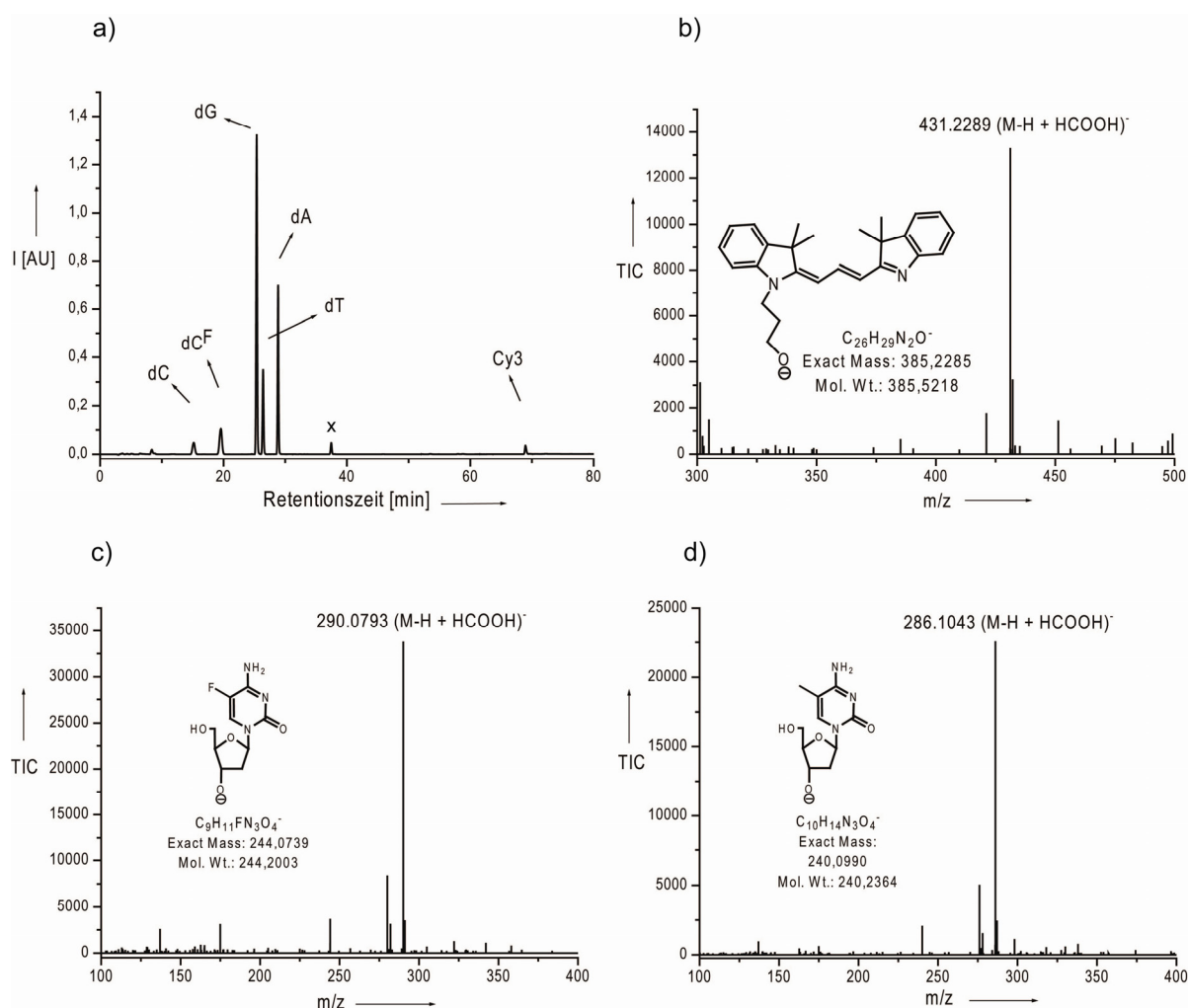


Abbildung 5.6 a) HPL-Chromatogramm des enzymatischen Totalverbaus von **S2** und Massenspektren der Spezies b) Cy3, c) dC^F und d) dC^M . Das mit X gekennzeichnete Signal stammt von einem unvollständig abgebauten Nukleosid. Die Moleküle wurden als Formiataddukte detektiert; $M(HCOOH) = 46.0055$ g/mol.

Als Puffersystem für die HPLC diente 2 mM Triethylammoniumformiat in Wasser (Puffer A) und 2 mM Triethylammoniumformiat in 80 % Acetonitril (Puffer B). Daher wurden die meisten Moleküle als Formiataddukte detektiert, was zu einer Erhöhung der Masse um 46.0055 u führte. Es konnte gezeigt werden, dass das TMP- dU^F -Derivat **10** vollständig zu dC^F umgewandelt wurde und als solches in der DNA vorlag. Neben den normalen Basen konnten auch dC^M sowie der Fluoreszenzfarbstoff Cy3 massenspektrometrisch nachgewiesen werden.

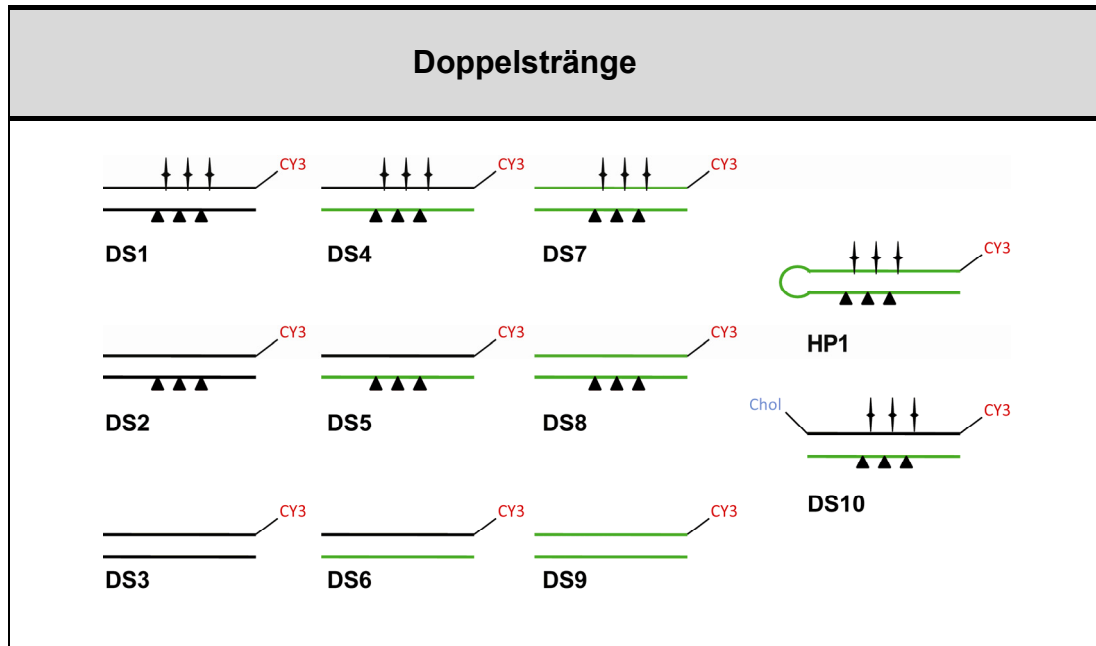
Durch die oben angeführten Methoden konnten sämtliche Oligonukleotide einwandfrei charakterisiert werden. Um nun die benötigten doppelsträngigen DNA-Suizidsubstrate und deren Kontrollen zu erhalten, wurden nach UV-spektroskopischer Konzentrationsbestimmung die zueinander komplementären Einzelstränge in äquimolaren Mengen miteinander vermischt und durch fünfminütiges Erhitzen auf 90 °C und anschließendes langsames Abkühlen auf RT hybridisiert. Einen Überblick über die einzel- und doppelsträngigen Oligonukleotide gibt Tabelle 5.2.

Tabelle 5.2 a) Übersicht aller verwendeten Oligonukleotide und **b)** Doppelstränge. PS (grün) = Phosphorothioat; PO (schwarz) = Phosphordiester; $M_{\text{ber.}}$ = berechnete Masse; $M_{\text{gef.}}$ = gefundene Masse; C^M / \blacktriangle = 5-Methyl-2'-desoxycytidin; C^F / \blackuparrow = 5-Fluor-2'-desoxycytidin; Chol = Cholesterol, Cy3 = Cyaninfarbstoff.

a)

ODN	Sequenz 3' → 5'	$M_{\text{ber.}}$	$M_{\text{gef.}}$	Rückgrat
S1	CGAGAGC ^F GC ^F GC ^F TGAGGTT–Cy3	6428,4	6430,6	PS
S2	CGAGAGC ^F GC ^F GC ^F TGAGGTT–Cy3	6139,2	6140,7	PO
S3	AACCTCAGC ^M GC ^M GC ^M TCTCG	5733,1	5733,8	PS
S4	AACCTCAGC ^M GC ^M GC ^M TCTCG	5460,0	5459,9	PO
S5	CGAGAGCGCGCTGAGGTT–Cy3	6374,5	6376,1	PS
S6	CGAGAGCGCGCTGAGGTT–Cy3	6085,3	6085,9	PO
S7	AACCTCAGCGCGCTCTCG	5691,1	5692,7	PS
S8	AACCTCAGCGCGCTCTCG	5418,0	5419,2	PO
S9	Chol–CGAGAGC ^F GC ^F GC ^F TGAGGTT–Cy3	6894,7	6892,7	PO
HP1	AACCTCAGC ^M GC ^M GC ^M TCTCGTTTTCG AGAGC ^F GC ^F GC ^F TGAGGTT–Cy3	13528,0	13530,7	PS

b)



Durch die Aufnahme von UV-Schmelzkurven konnte gezeigt werden, dass alle Substrate bei RT stabile Doppelstränge ausbildeten. Dazu wurden 3 μM Lösungen der DNA in 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) und 150 mM NaCl hergestellt und in UV-Küvetten gefüllt. Diese wurden in 0.5 $^{\circ}\text{C}$ -Schritten über fünf Zyklen von 85–0 $^{\circ}\text{C}$ abgekühlt und wieder erwärmt. Dabei wurde die Absorption der Lösungen bei zwei verschiedenen Wellenlängen (260 nm und 320 nm) detektiert. Zur Bestimmung des Schmelzpunkts wurde jeweils das Mittel der Zyklen bestimmt und die so erhaltene Kurve durch ein Polynom 9. Ordnung genähert. Die Nullstellen der zweiten Ableitung dieser Approximationsfunktion stellten die gesuchten Schmelzpunkte dar.

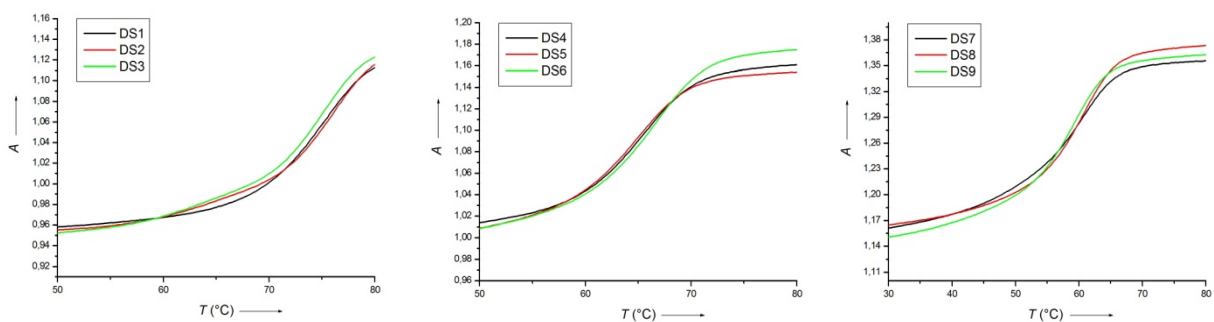


Abbildung 5.7 UV-Schmelzkurven der Stränge DS1–9.

In Abbildung 5.7 sind die Schmelzkurven der Doppelstränge **DS1–9** abgebildet. Der Einfluss von Phosphorothioatmodifikationen auf die Stabilität von DNA-Doppelsträngen ist zum Einen auf die hohe Anzahl an unterschiedlichen Stereoisomeren zurückzuführen, die bei der Festphasensynthese entstehen. Wird ein nichtverbrückendes Sauerstoffatom des Phosphordiester-Rückgrats durch ein Schwefelatom ersetzt, resultieren daraus zwei verschiedene Diastereomere. Bezogen auf ein Oligonukleotid mit 18 Basen ergeben sich also bereits 2^{17} Diastereomere. Die damit verbundenen sterischen Effekte führen zu einer schlechteren Basenpaarung und somit zu einer schwächeren Hybridisierung, also einer niedrigeren Schmelztemperatur.^[344, 345] Zum Anderen ist der Raumanspruch des Schwefelatoms größer als der des Sauerstoffs und durch die Lokalisation der negativen Ladung am Schwefel kommt es zusätzlich zum höheren sterischen Anspruch auch noch zu einer verstärkten Abstoßung der Phosphorothioatrückgrate.^[346] Die Nukleobasen beider Doppelstränge von **DS1–3** sind über Phosphordiester miteinander verbunden und besitzen daher die höchsten Schmelzpunkte. Dieser beträgt hier im Durchschnitt 75 °C. Wird ein Strang durch ein Phosphorothioatrückgrat ersetzt, sinkt der Schmelzpunkt bereits auf 64 °C (**DS4–6**). Sind beide Stränge komplett modifiziert (**DS7–9**) liegt er bei 57 °C.

Eine weitere Eigenschaft von doppelsträngiger DNA ist ihre Helixform. Normalerweise nimmt die DNA als Duplex die sogenannte B-Form ein. Um experimentell zu klären, dass auch die hier verwendeten Duplexe dieser Form entsprechen, wurden sie mit Hilfe von Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD) untersucht.

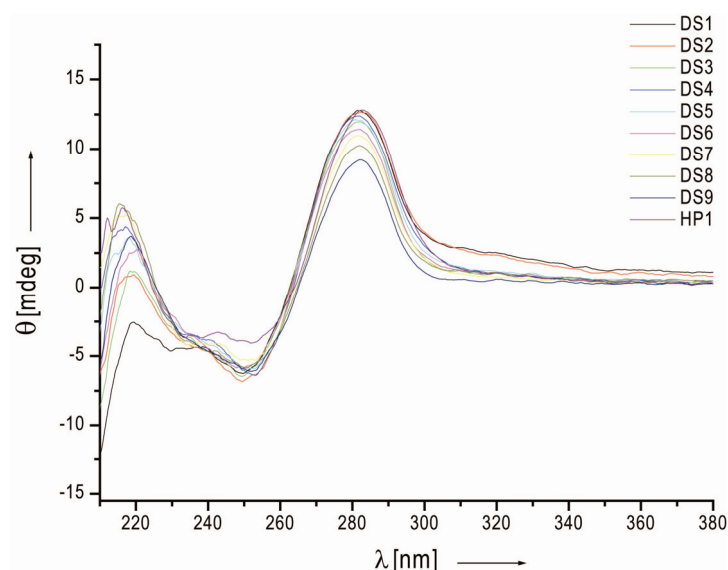


Abbildung 5.8 CD-Spektren der Stränge **DS1–9** sowie des Hairpins **HP1**.

Abbildung 5.8 zeigt die CD-Spektren der Doppelstränge. Man erkennt deutlich den für B-DNA typischen Verlauf mit den Maxima bei $\lambda = 280$ nm und $\lambda = 220$ nm sowie einem Minimum bei $\lambda = 250$ nm.^[347]

Zuletzt wurden UV-Absorptions- sowie Fluoreszenzemissionsspektren aufgenommen, um eine empfindliche Detektierbarkeit der DNA-Konstrukte sicherzustellen (Abb. 5.9). Die DNA-Basen absorbierten bei $\lambda = 260$ nm, der Cyaninfarbstoff bei $\lambda = 552$ nm. Die Fluoreszenzwellenlänge hatte ein Maximum bei $\lambda = 570$ nm.^[348]

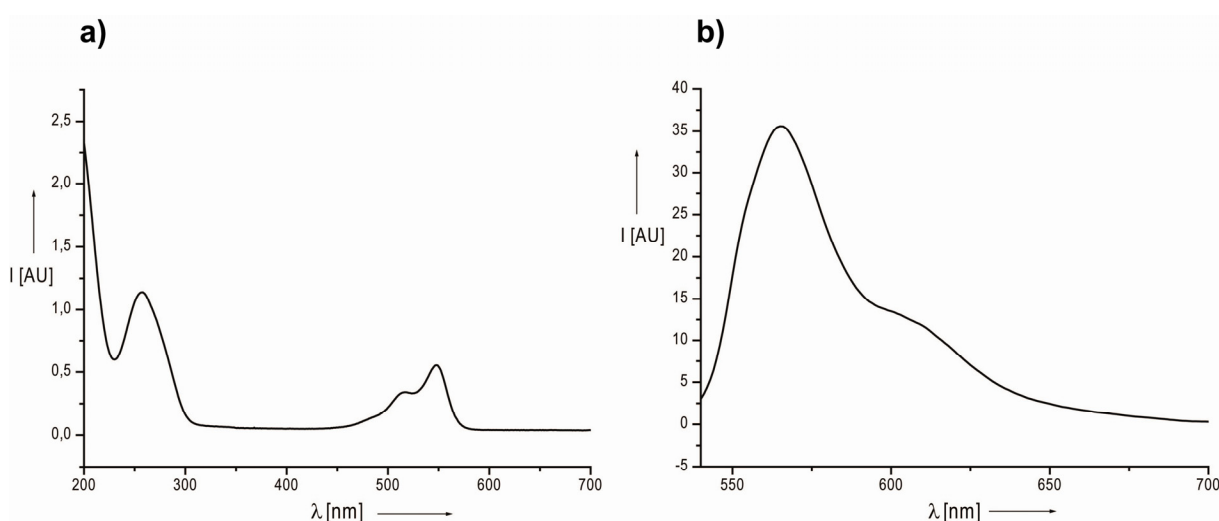


Abbildung 5.9 a) UV-Absorptionsspektrum von **DS1** mit den Absorptionsmaxima bei $\lambda = 260$ nm und 552 nm, sowie b) das zugehörige Fluoreszenzemissionsspektrum mit dem Maximum bei $\lambda = 570$ nm.

Die ausführlich charakterisierten DNA-Duplexe standen jetzt für die nun folgenden *in vitro* Experimente zur Verfügung.

5.1.5 *In vitro* Untersuchungen I: Aktivitätsassays

Bevor mit den Versuchen zur Wirkung der Inhibitoren auf Methyltransferasen begonnen wurde, sollte geklärt werden, ob ein späterer Einsatz in lebenden Zellen in Erwägung gezogen werden kann. Ein wichtiges Kriterium hierfür ist die Stabilität der DNA-Konstrukte gegen Nukleasen. Ist dies nicht gegeben, wie man es für die

unmodifizierten Doppelstränge **DS1–3** erwartet, würde das bedeuten, dass diese später in Zellstudien sehr schnell abgebaut werden. Ein demethylierender Effekt müsste dann eher auf die Wirkung freigesetzter und im Anschluss in genomische DNA integrierter dC^F-Nukleoside zurückgeführt werden und nicht auf die Wirkung der DNA-Suizidsubstrate.

Daneben ist es wichtig, dass die Bindung der DNA-Duplexe an die Methyltransferasen selektiv erfolgt und es möglichst wenige unspezifische Wechselwirkungen mit anderen Enzymen gibt, was durch Inkubation der jeweiligen Konstrukte mit HCT116-Zelllysaten untersucht wurde.

Anschließend wurden mit Hilfe von *electrophoretic mobility shift assays* Studien zum DNA-Enzym-Bindungsverhalten durchgeführt. Dabei wurden die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten DNA-Inhibitoren und ihre Kontrollen mit der jeweiligen Methyltransferase inkubiert und die Reaktionen danach unter denaturierenden Bedingungen durch SDS-Acrylamid-Gelelektrophorese analysiert. Eine stabile Bindung konnte man am Auftreten einer zweiten, wesentlich langsamer laufenden Bande als die der freien, ungebundenen DNA erkennen (*bandshift*).

Um festzustellen, ob sich die gewonnenen Ergebnisse auch auf die Methylierungsaktivität der Enzyme übertragen lassen, wurden die Oligonukleotide und Methyltransferasen einem Restriktionsaktivitätsassay unterworfen.

In allen Experimenten wurden sowohl die bakteriellen Enzyme M.HhaI und M.SssI als auch die humane DNMT1 eingesetzt. Da die prokaryotischen Methylasen wesentlich leichter zugänglich, sehr viel stabiler und weitaus weniger komplex sind, dienen sie sehr häufig als Modelle für die eukaryotischen Analoga.^[51, 63, 305, 349, 350]

5.1.5.1 Stabilitätstests

Da Oligonukleotide mit einem Phosphorothioatrückgrat im Vergleich zu Oligonukleotiden mit einem natürlichen Phosphordiesterückgrat eine erhöhte Stabilität gegenüber Nukleasen zeigen, finden diese schon länger Anwendung in klinischen Studien, hauptsächlich bei *Antisense*- und RNAi-Strategien.^[351-356] Um einen direkten Vergleich der Stabilitäten der hier untersuchten Doppelstränge zu erhalten, wurde jeweils ein Vertreter der entsprechend modifizierten Stränge (PO-PO: **DS1**, PO-PS: **DS10**, PS-PS: **DS7** und PS-PS-Haarnadel: **HP1**) mit einer Exonuklease (Exonuklease III, Abb. 5.10 a), einer Endonuklease (DNase I, Abb.

5.10 b)) und mit einem Zelllysats von HCT116-Darmkrebszellen (Abb. 5.10 c)) über mehrere Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionen per denaturierender PAGE analysiert.

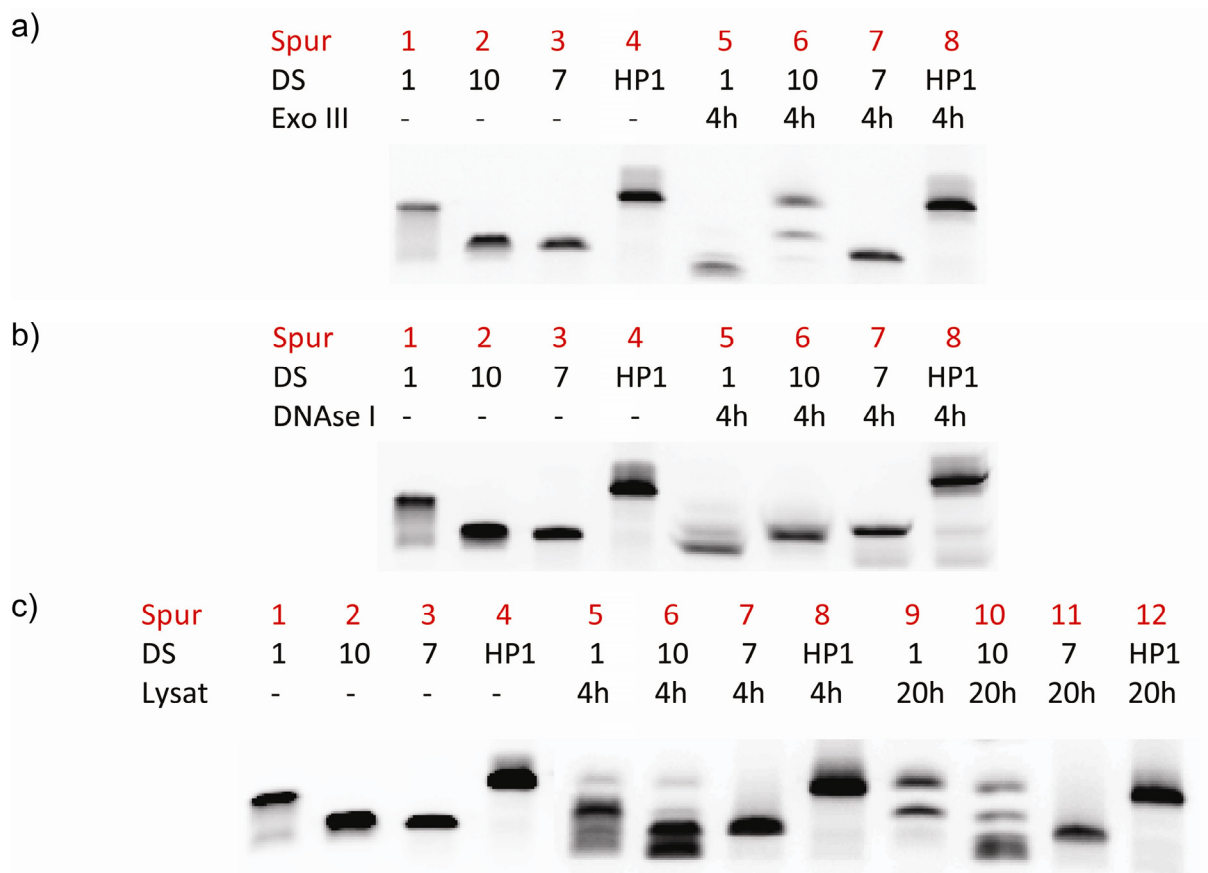


Abbildung 5.10 Resistenzen der DNA-Duplexe im Vergleich: **a)** gegen Exonuklease III (Exo III) **b)** gegen DNase I **c)** gegen HCT116-Zelllysats. Schneller laufende Banden im Vergleich zu denen der intakten Duplexe zeigen die Zersetzung der DNA-Stränge an. In manchen Fällen traten auch langsamer laufende Banden auf, welche von nicht vollständig denaturierten DNA-Enzym-Komplexen herrührten.

Man kann deutlich erkennen, dass der Doppelstrang **DS1** (und somit auch **DS2** und **DS3**), dessen Nukleoside über natürliche Phosphordiesterbindungen verknüpft waren, in allen drei Fällen durch die vorhandenen Nukleasen abgebaut wurde, was sich durch das Entstehen von schneller laufenden Banden manifestierte (Abb. 5.10 a) und b) *Spur 5*; c) *Spuren 5 und 9*). Wurde ein Halbstrang durch ein Oligodesoxynukleotid mit Phosphorothioatrückrat ersetzt (**DS4**, **5**, **6** und **10**), zeigten diese Duplexe bereits eine etwas erhöhte Resistenz gegen die Exonuklease sowie das Zellextrakt (Abb. 5.10 a) *Spur 6*; c) *Spuren 6 und 10*). Nach 4 h Inkubation mit

Exonuklease III war lediglich eine weitere, langsamer laufende Bande zu sehen, die eher auf einen nicht vollständig denaturierten DNA-Enzym-Komplex schließen ließ (Abb. 5.10 a) *Spur 6*). Die verwendete Endonuklease konnte den Strang nicht hydrolysieren (Abb. 5.10 b) *Spur 6*). **DS10** wurde als Testsubstrat für halbmodifizierte Duplexe gewählt, da dieser zusätzlich am 3'-Ende über einen Linker mit einem Cholesterolmolekül verbunden war. Diese Art von Substituenten kann als Kappe fungieren, was zu einem erhöhten Schutz gegen die Restriktion durch Exonukleasen führt.^[357] Trotzdem waren nach 20 h Inkubation mit dem Zelllysats eindeutige Zersetzungsprodukte zu sehen (Abb. 10 c) *Spur 10*). Nur die komplett modifizierten Doppelstränge **DS7**, **DS8** und **DS9** sowie die Haarnadel **HP1** zeigten im Rahmen dieser Testreihen keine Zersetzungerscheinungen und waren bezüglich der Stabilität die vielversprechendsten Kandidaten für spätere Experimente in lebenden Zellen.

5.1.5.2 Unspezifische Wechselwirkungen

Eine Voraussetzung für den erfolgreichen Einsatz eines Enzyminhibitors *in vivo* ist seine spezifische Bindung an das zu hemmende Protein. Kommt es zu unspezifischen Wechselwirkungen mit anderen Proteinen, schwächt das zum Einen die inhibitorische Wirkung, weshalb höhere Dosen verabreicht werden müssen, zum Anderen kann es zu gravierenden Nebenwirkungen kommen. Es ist bekannt, dass durch die Modifikation des Phosphordiesterrückgrats zum Phosphorothioatrückgrat die so veränderte DNA ein ebenfalls stark verändertes Bindungsverhalten zeigt und unspezifisch mit verschiedenen Proteinen wechselwirkt.^[314, 327]

Um die Unterschiede der Duplexe mit Phosphordiester-verknüpften Nukleobasen und solchen mit einem halben bzw. kompletten Phosphorothioatrückgrat in Bezug auf ihr Bindungsverhalten aufzuzeigen, wurden die jeweiligen DNA-Stränge mit einem Lysat von HCT116-Zellen bei 37 °C für 1 h inkubiert und die Reaktionsmischung per SDS-PAGE analysiert (Abb. 5.11).

Die fluoreszenten Banden entstanden durch Bindung des jeweiligen DNA-Stranges an Proteine des Lysats. Man erkennt deutlich eine Zunahme der Anzahl und Intensität dieser Banden mit gesteigertem Grad an Phosphorothioatmodifikationen. Die Duplexe **DS7** und **HP1** waren zwar durch ihre vollständige Umwandlung in Phosphorothioate am stabilsten gegenüber Nukleasen, zeigten aber im Vergleich mit

den nicht oder nur halb modifizierten Strängen **DS1** und **DS4** ein viel höheres unspezifisches Bindungsverhalten.

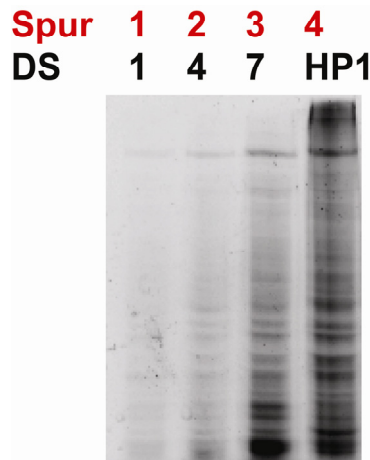


Abbildung 5.11 Unspezifische Wechselwirkung der Stränge **DS1**, **DS4**, **DS7** und **HP1** mit Proteinen eines HCT116-Zelllysats. Es wurden jeweils 40 pmol DNA und 46 µg Lysat für 1 h bei 37 °C inkubiert.

5.1.5.3 EMSA-Studien mit den bakteriellen Methyltransferasen M.HhaI und M.SssI

Die bakteriellen Methyltransferasen M.HhaI und M.SssI werden auf Grund ihrer prinzipiell sehr ähnlichen Reaktivität sowie der einfacheren Zugänglichkeit und Handhabung häufig als Modellsysteme für die humane Methyltransferase DNMT1 verwendet.^[63, 350] M.HhaI methyliert die erste Cytidinbase in 5'-GCGC-3'-Sequenzen zu 5'-GC^MGC-3', M.SssI sämtliche 5'-CG-3'-Einheiten. Im Gegensatz zur DNMT1 zeigen diese Methylasen allerdings keine Präferenz für hemimethylierte Substrate. Die dreifache CpG-Einheit in den DNA-Duplexen sollte daher eine geeignete Erkennungssequenz für die Methyltransferasen sein. Für die Suizidsubstrate **DS1**, **DS4** und **DS7** würde man folglich die Ausbildung eines kovalenten Komplexes mit dem Enzym erwarten.

Jeweils die selbe Menge der Stränge **DS1–9** wurde mit den Enzymen M.HhaI (Abb. 5.12) bzw. M.SssI (Abb. 5.13) und dem Kofaktor SAM für 2 h bei 37 °C in dem entsprechenden Puffer inkubiert und die Reaktionen anschließend per denaturierender PAGE analysiert.

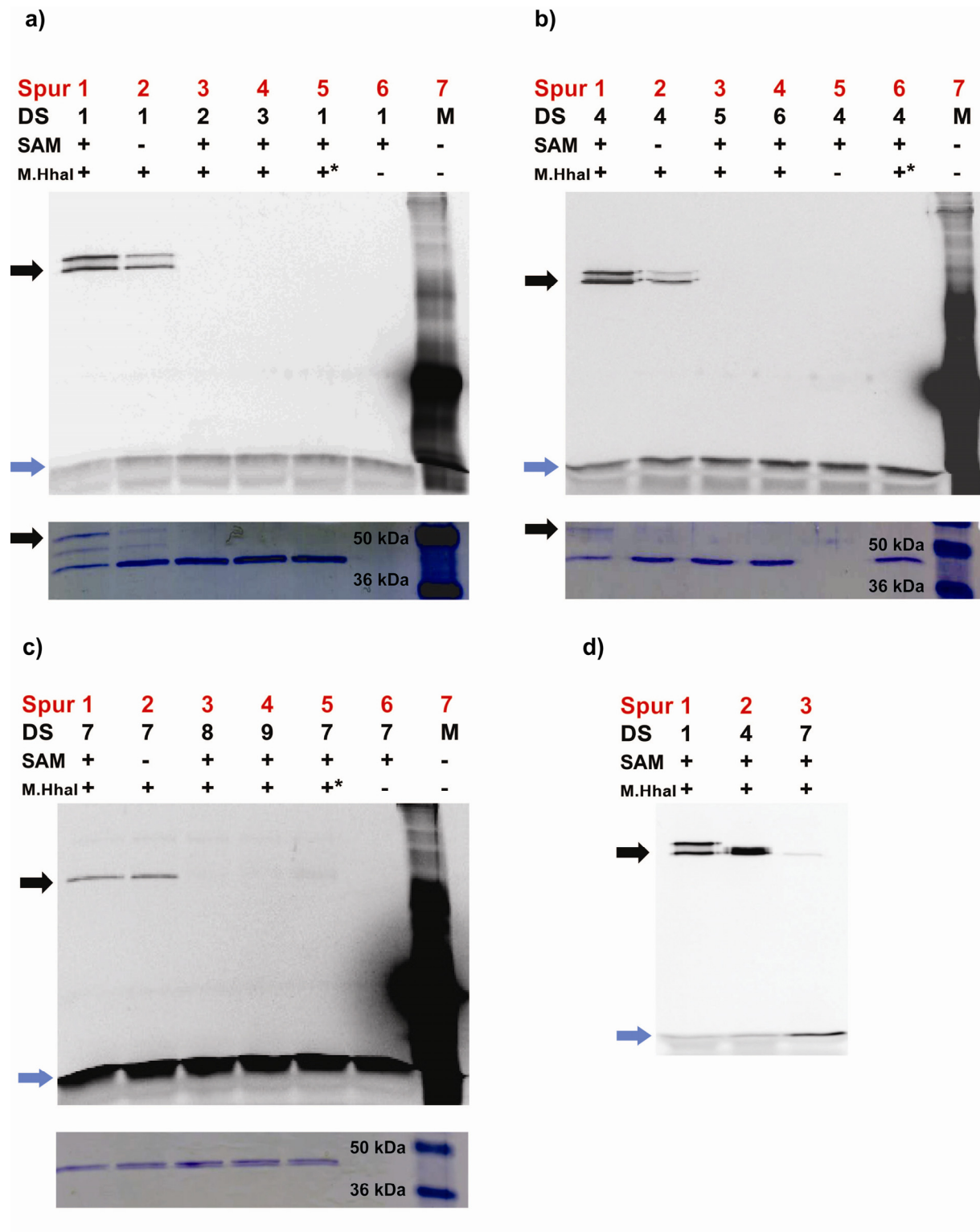


Abbildung 5.12 EMSAs der Reaktionen von **DS1–9** (3.2 pmol) mit M.HhaI (13.4 pmol). **a)**, **b)** und **c)** Fluoreszenzdetektion und darunter *Coomassie Blue* Färbung der SDS-Acrylamidgele. Schwarze Pfeile kennzeichnen die DNA-Enzym Komplexe, blaue Pfeile die freie, ungebundene DNA. **d)** Direkter Vergleich der EMS-Assays von **DS1**, **DS4** und **DS7**. M = Gewichtsmarker; * = Hitzedenaturierung des Enzyms vor Inkubation.

Nur die Suizidsubstrate **DS1**, **DS4** und **DS7** bildeten sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von SAM einen stabilen Komplex mit M.HhaI und M.SssI. Dieser ist in Form einer zweiten fluoreszenten Bande sichtbar, die langsamer als die der freien, ungebundenen DNA lief (Abb. 5.12 a), b) und c), *Spuren 1 und 2*; Abb. 5.13 a), b) und c), *Spuren 1 und 2*). Das Auftreten von Doppelbanden kann dadurch erklärt werden, dass der hemimethylierte Strang teilweise von dem mit dem Enzym kovalent verbundenen Strang abdissoziierte. Die Beobachtung, dass bakterielle Methyltransferasen mit Inhibitorbasen enthaltenden Oligonukleotiden in Abwesenheit des Kofaktors ebenfalls stabile Komplexe ausbildeten, wenngleich diese vergleichsweise schwächer waren, deckt sich mit entsprechenden Berichten in der Literatur.^[105, 250, 305, 358] Allerdings waren nur die kovalenten Komplexe, die sich in Anwesenheit des Kofaktors durch Übertragung einer Methylgruppe ausbildeten, auch gegen stärker denaturierende Bedingungen, wie längeres Erhitzen auf 95 °C in denaturierendem SDS-Puffer, stabil (Ergebnis nicht abgebildet). Hier wurden die Reaktionsmischungen vor dem Auftragen auf das Gel allerdings nur kurz (5 min) auf 95 °C erhitzt. Das führte dazu, dass Enzyme mit gebundener DNA langsamer liefen als freie, ungebundene Enzyme, was anhand der *Coomassie*-gefärbten Gele gut zu sehen ist.^[201] In diesem Kontext ist anzumerken, dass die Zuordnung einer molekularen Masse aufgrund des Laufverhaltens im SDS-PAGE immer *cum grano salis* zu betrachten ist, da sich abhängig von der Zusammensetzung des Proteins die tatsächliche Masse und das augenscheinliche Laufverhalten teils beträchtlich unterscheiden können. Sowohl die Massen der Enzyme M.HhaI (37 kDa) und M.SssI (42 kDa) als auch die Massen der DNA-Enzym-Komplexe stimmen hier allerdings recht gut mit dem Gewichtsmarker (*Fa. Invitrogen*) überein.

Um sicherzustellen, dass die Bindung zwischen DNA und Enzym nicht unspezifisch und nur durch aktives Enzym gebildet wurde, wurden die Methyltransferasen vorher durch Erhitzen auf 90 °C für 10 min inaktiviert und anschließend mit der Inhibitor-DNA inkubiert. Da in diesem Fall keine Fluoreszenzbanden von DNA-Enzym-Komplexen detektiert wurden, konnte die spezifische Bindung von Enzym und Substrat somit bestätigt werden (Abb. 5.12 a) und c) *Spuren 5* und b) *Spur 6*, sowie Abb. 5.13 a), b) und c) *Spuren 5*).

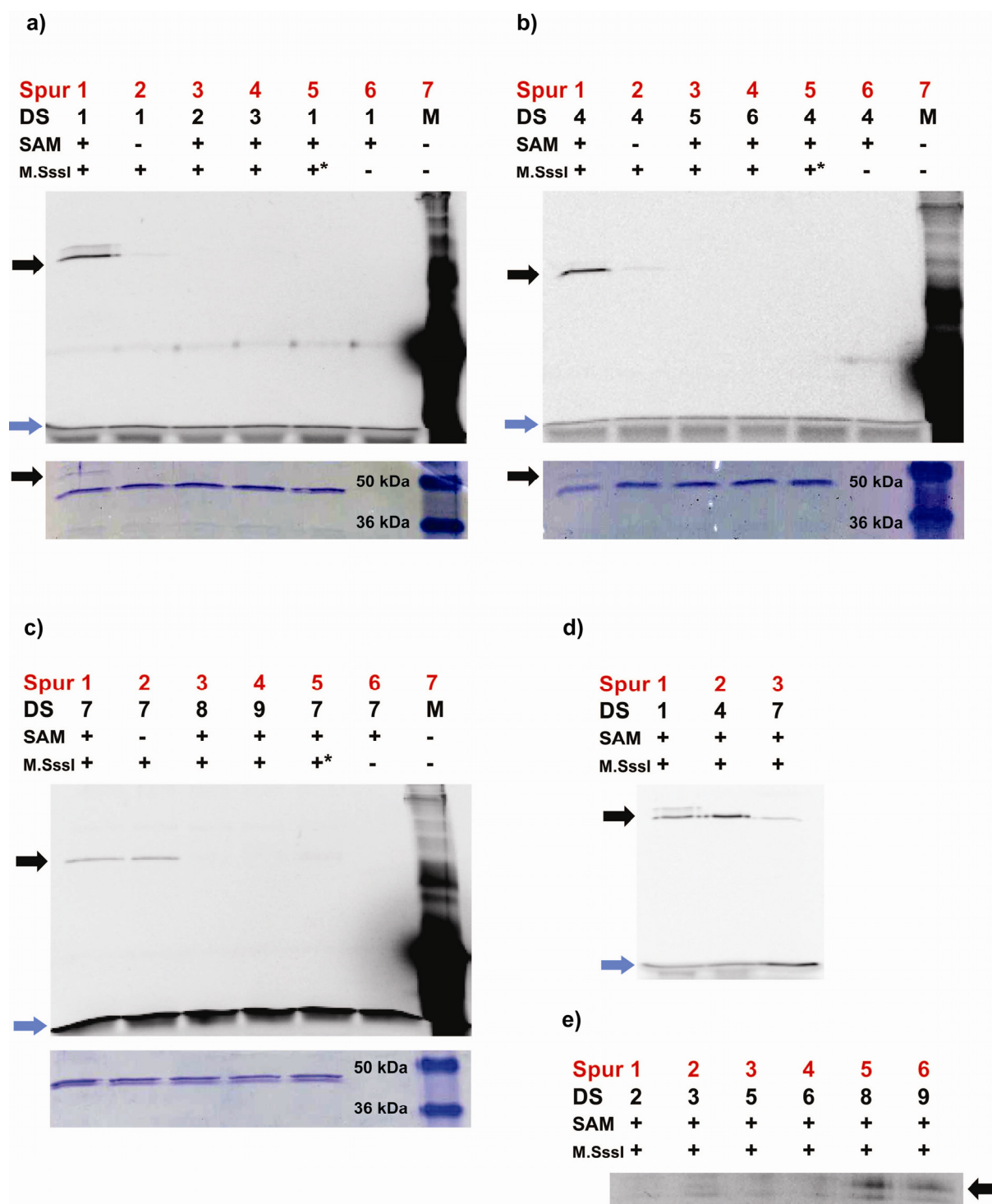


Abbildung 5.13 EMSA der Reaktionen von **DS1–9** (3.2 pmol) mit M.SssI (12.9 pmol). **a), b)** und **c)** Fluoreszenzdetektion und darunter *Coomassie Blue* Färbung der SDS-Acrylamidgele. Schwarze Pfeile kennzeichnen die DNA-Enzym Komplexe, blaue Pfeile die freie, ungebundene DNA. **d)** Direkter Vergleich der EMS Assays von **DS1**, **DS4** und **DS7**. **e)** Direkter Vergleich der Enzym-DNA Komplexe der Kontrollstränge ohne vorherige Hitzedenaturierung. M = Gewichtsmarker; * = Hitzedenaturierung des Enzyms vor Inkubation.

In Abbildung 5.12 d) und Abbildung 5.13 d) wurden die Reaktionen der Suizidsubstrate **DS1**, **DS4** und **DS7** mit der jeweiligen Methylase nebeneinander aufgetragen, um einen besseren Vergleich der Menge der gebildeten Komplexe zu erhalten. Deutlich ist zu sehen, dass die fluoreszente Bande des Komplexes von **DS7** sowohl mit M.HhaI als auch mit M.SssI im Unterschied zu **DS1** und **DS4** wesentlich weniger intensiv war, wobei im Fall von M.HhaI fast keine detektierbare Fluoreszenz mehr auftrat. Je höher also der Grad an Phosphorothioatmodifikation der Duplexe, desto schwächer war die Ausbildung eines kovalenten Komplexes mit den beiden bakteriellen Methyltransferasen. Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in den *Coomassie*-gefärbten Gelen für **DS7** wider, bei denen die Menge an gebundenem Enzym für eine Färbung zu gering war.

Für alle DNA-Doppelstränge, die kein dC^F besaßen, konnte keine Komplexbildung detektiert werden. Wurden die Reaktionsmischungen allerdings vor dem Auftragen auf das Gel nicht durch Erhitzen denaturiert, traten deutliche Fluoreszenzbanden auf, die eine Bindung der Phosphorothioate **DS8** und **DS9** an M.SssI anzeigten, (Abb. 5.13 e)), nicht jedoch an M.HhaI (nicht abgebildet). Die Stränge **DS2**, **DS3**, **DS5** und **DS6** zeigten dagegen keine derartig intensiven Banden.

5.1.5.4 EMSA-Studien mit der humanen Methyltransferase DNMT1

Dieselben Experimente wurden nun mit der weitaus komplexeren humanen Methyltransferase DNMT1 wiederholt. Es wurden Stoffmengen von 4 pmol DNA und 7.5 pmol DNMT1 eingesetzt. Das Enzym war im Gegensatz zu den bakteriellen Methylasen wesentlich empfindlicher gegenüber Auftau- und Einfrierprozessen. Zudem entsprachen die Angaben des Herstellers (*Fa. New England Biolabs*) über Konzentration und Aktivität der gelieferten Enzyme häufig nicht der Realität. Die Ergebnisse der EMS-Assays sind in Abbildung 5.14 dargestellt.

Die Reaktionsmischungen wurden vor dem Auftragen auf das Gel durch fünfminütiges Erhitzen auf 95 °C in SDS-Auftragspuffer denaturiert. Im Gegensatz zu den bakteriellen Enzymen, die sehr gut an **DS1** gebunden haben, konnte für DNMT1 keine Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes detektiert werden (Ergebnis nicht abgebildet). Die Bindung des DNA-Duplexes **DS1** an DNMT1 wurde erst durch den Einsatz von drei Äquivalenten des Stranges sichtbar (Abb. 5.14 d) *Spur 1*).

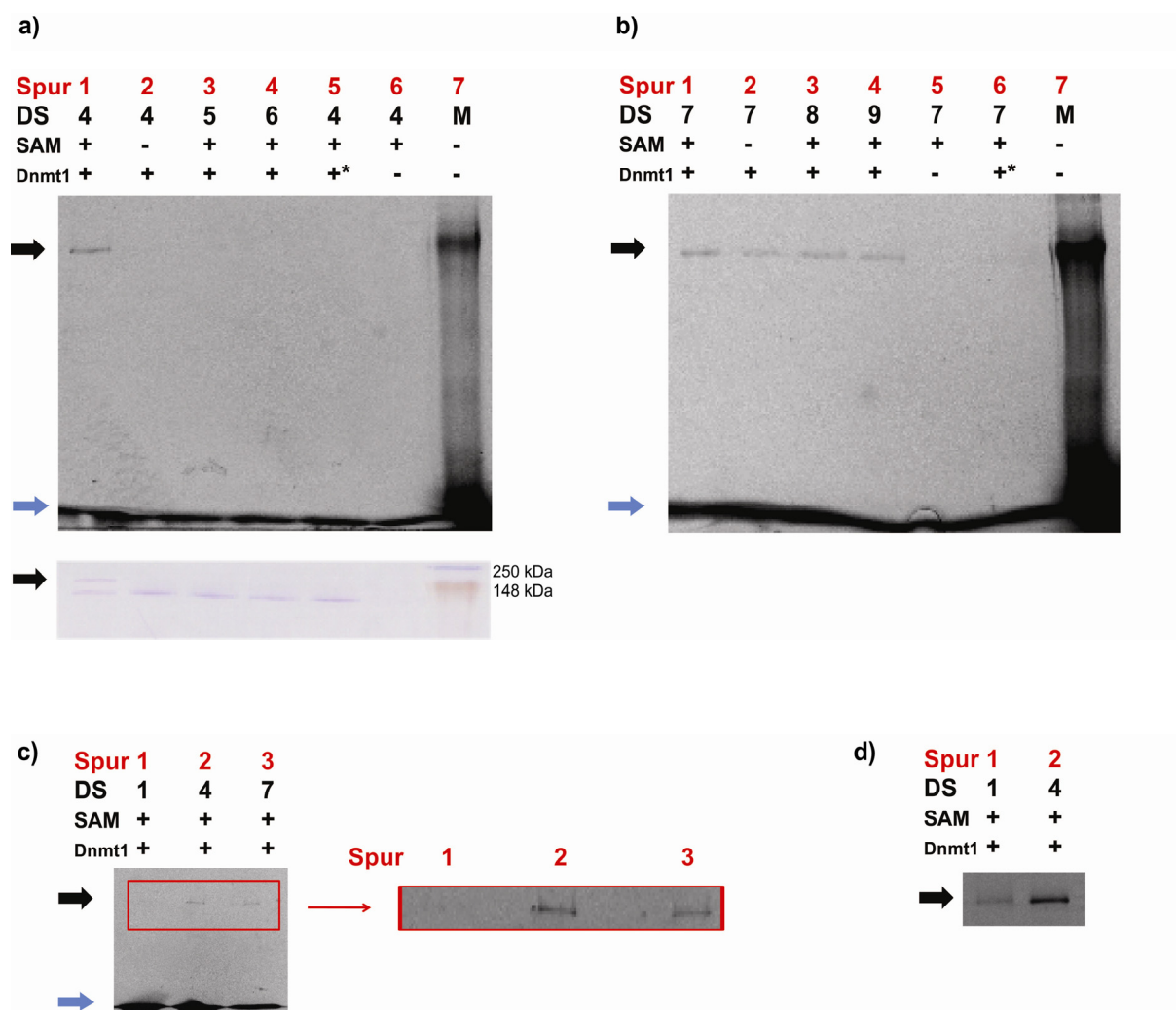


Abbildung 5.14 EMSA der Reaktionen von **DS4–9** (4.0 pmol) mit DNMT1 (7.5 pmol).
a) Fluoreszenzdetektion und *Coomassie Blue* Färbung der Assays von **DS4–6**;
b) Fluoreszenzdetektion der Assays von **DS7–9**. **c)** Direkter Vergleich der EMS Assays von **DS1**, **DS4** und **DS7**. Zum besseren Vergleich wurde der rot markierte Bereich vergrößert.
d) Vergleich der EMSAs von **DS1** und **DS4** (jeweils 25 pmol DNA mit 7.5 pmol Enzym).
 Schwarze Pfeile kennzeichnen die DNA-Enzym-Komplexe, blaue Pfeile die freie, ungebundene DNA. M = Gewichtsmarker; * = Hitzedenaturierung des Enzyms vor Inkubation.

Im Vergleich dazu bildete DNMT1 wesentlich besser Komplexe mit **DS4** und **DS7**, deren Fluoreszenzintensitäten nahezu gleich stark waren (Abb. 5.14 a) *Spur 1*, b) *Spur 1* und c) *Spuren 2 und 3*). In dem *Coomassie*-gefärbten Gel wurde das freie Enzym (190 kDa) nahe der 140-kDa-Markierung des Gewichtsmarkers detektiert, während der DNA-Enzym-Komplex etwas langsamer lief (Abb. 5.14 a) unten).

Die Modifikation vom Phosphordiester- zum Phosphorothioatrückgrat des hemimethylierten Gegenstrangs von **DS1** zu **DS4** hatte eine deutlich stärkere

Bindung des Enzyms an den DNA-Duplex zur Folge (Abb. 5.14 d)), allerdings nur in Anwesenheit des Kofaktors (Abb. 5.14 a) *Spuren 1 und 2*). Dagegen trat eine fluoreszente Bande des Komplexes von DNMT1 mit dem Strang **DS7** auch in Abwesenheit von SAM auf (Abb. 5.14 b) *Spur 2*). DNMT1 zeigte keine Affinität zu den Kontrollsträngen **DS5** und **DS6**, wohl aber zu den Kontrollduplexen **DS8** und **DS9**, die ein komplettes Phosphorothioatrückgrat besaßen (Abb. 5.14 a) und b) *Spuren 3 und 4*). Dasselbe Verhalten wurde auch schon für die bakterielle Methylase M.SssI beobachtet (vgl. Kapitel 5.1.5.3). Im Falle der DNMT1 waren die DNA-Enzym-Komplexe allerdings stärker, da sie auch trotz denaturierender Bedingungen erhalten blieben und im Gel sichtbar waren (Abb. 5.14 b) *Spuren 3 und 4*).

Die höhere Stabilität des Enzym-Substrat-Komplexes von **DS7** im Vergleich zu **DS8** und **DS9** konnte nachgewiesen werden, indem man die Reaktionen vor dem Auftragen auf das Gel stärker denaturierenden Bedingungen aussetzte und 10 min anstatt 5 min auf 95 °C erhitze. Während die fluoreszenten Banden für **DS8** und **DS9** sowie in Abwesenheit des Kofaktors SAM auch für **DS7** komplett verschwanden, blieb die Fluoreszenz des Enzym-DNA-Komplexes von **DS7** in Anwesenheit von SAM bestehen (Abb. 5.15). Dies ist ein Indiz dafür, dass DNMT1 trotz unspezifischer Wechselwirkung mit den Phosphorothioat-Doppelsträngen bei Anwesenheit von SAM mit dem Nukleosid dC^F eine kovalente Bindung ausbildete.

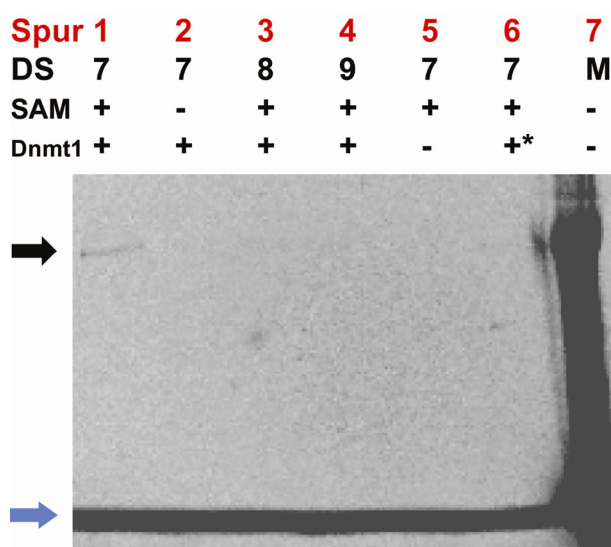


Abbildung 5.15 EMSA der Reaktionen von **DS7–9** (4.0 pmol) mit DNMT1 (7.5 pmol) nach 10 min Erhitzen auf 95 °C in SDS-Auftragspuffer. Der schwarze Pfeil kennzeichnet den DNA-Enzym-Komplex, der blaue Pfeil die freie, ungebundene DNA.

5.1.5.5 Restriktions-Schutzassays

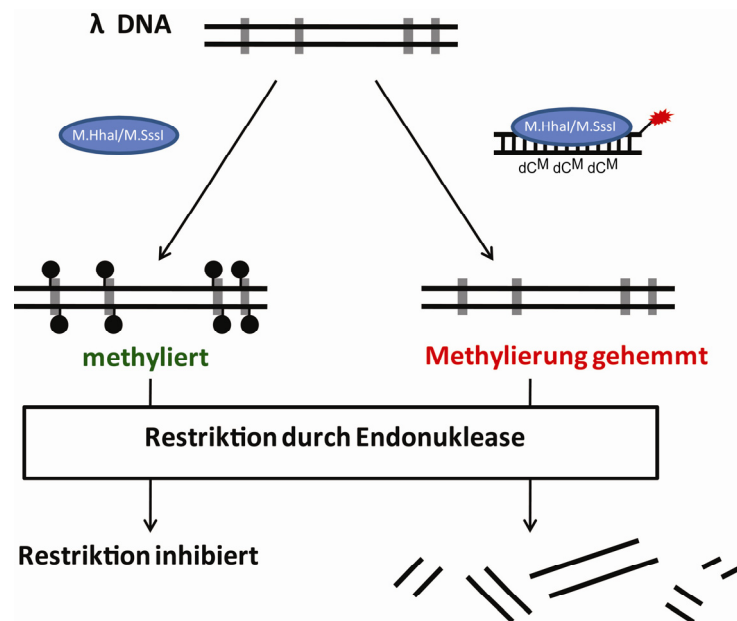
Ob die in den EMSA-Experimenten gewonnenen Ergebnisse auch auf die Inhibierung der Methyltransferasen übertragbar sind, sollte nun anhand von Restriktions-Schutzassays überprüft werden. Dabei wurde der Einfluss der Oligonukleotide **DS1–9** auf die Methylierungsaktivität der Methyltransferasen getestet.

Wie bereits in der Einführung erklärt wurde, besteht die Hauptaufgabe von bakteriellen Methyltransferasen darin, virale Fremd-DNA abzuwehren. Dies geschieht durch Methylierung der eigenen DNA, sodass diese von zelleigenen Restriktionsenzymen nicht mehr angegriffen werden kann. Die Fremd-DNA wird dagegen nicht methyliert und bleibt deshalb ein Substrat für die Restriktionsenzyme. Das bedeutet, dass es zu jeder bakteriellen Methyltransferase ein passendes Restriktionsenzym mit derselben Erkennungssequenz gibt.^[49, 53, 305] Diese Methode sollte nun genutzt werden, um die Aktivität der Methyltransferasen zu bestimmen. Grundsätzlich wurde hierbei DNA, die passende Zielmotive enthielt, mit der jeweiligen Methyltransferase inkubiert und anschließend einem Verdau mit dem entsprechenden Restriktionsenzym unterworfen. Ob die Methylase in der Lage war, die DNA zu methylieren, sie also zu schützen, zeigte sich nach der Analyse der Reaktionsmischungen auf einem Polyacrylamidgel. Geschnittene DNA zeigte keine oder unvollständige Methylierung, also Aktivitätsverlust der Methyltransferase durch Hemmung an, ungeschnittene DNA hingegen, dass die Enzymaktivität durch den entsprechenden DNA-Duplex nicht beeinflusst wurde.

Bakterielle Methyltransferasen (M.HhaI und M.SssI)

Die Experimente mit den prokaryotischen Methyltransferasen wurden nach den vom Hersteller (*New England Biolabs*) beschriebenen Restriktions-Schutzassays durchgeführt. Dabei wird eine Einheit (U, *unit*) des Enzyms M.HhaI (Erkennungssequenz 5'-GCGC-3') bzw. M.SssI (Erkennungssequenz 5'-CG-3') als die Menge definiert, die ausreicht, um 1 µg DNA der Phage λ innerhalb einer Stunde bei 37 °C bzw. 60 °C vor der Restriktion durch die entsprechende Endonuklease (HhaI Endonuklease: Erkennungssequenz 5'-GCG'C-3' bzw. BstUI: Erkennungssequenz 5'-CG'CG-3') zu schützen. In Schema 5.5 ist das Prinzip zur

Prüfung der Aktivität der DNA-Inhibitoren gezeigt. Die DNA-Duplexe, die aktiv sind, hemmen die jeweilige Methyltransferase und verhindern somit die Methylierung der λ -DNA, welche anschließend durch die entsprechende Endonuklease verdaut wird. Wie sich die einzelnen Doppelstränge auf die Methylierung durch M.HhaI bzw. M.SssI auswirken, ist in Abbildung 5.16 gezeigt.



Schema 5.5 Restriktions-Schutzassay zur Prüfung der Inhibitionswirkung von **DS1–9**. Die aktive Methyltransferase schützt die λ -DNA durch Methylierung vor dem Verdau durch die entsprechende Endonuklease (links). Die Methyltransferase wird durch ein Inhibitor-oligonukleotid gehemmt und kann somit die λ -DNA nicht mehr methylieren. Diese wird anschließend durch die Endonuklease geschnitten (rechts). *Grau*: Erkennungssequenz; *Schwarze Kreise*: dC^M.

Zuerst wurde die Methyltransferase (6.7 pmol) mit jeweils drei verschiedenen Konzentrationen (4.0, 8.0 und 16.0 pmol) des jeweiligen aktiven DNA-Strangs **DS1**, **DS4** bzw. **DS7** oder 16.0 pmol der Kontrollstränge für 75 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde λ -DNA zugegeben und die Reaktion für 4 h fortgesetzt. Nach dem folgenden Restriktionsverdau wurden die Reaktionsmischungen per denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert. Es wurden drei verschiedene Kontrollen gemacht. Zuerst wurde das Experiment ohne die Methylase mit dem jeweiligen Suizidsubstrat durchgeführt, um zu gewährleisten, dass es nicht zu einer Hemmung des Restriktionsenzym bedingt durch den Inhibitor kam (Abb. 5.16 *Spuren 6*). Zweitens wurde kontrolliert, dass die Methyltransferase ohne Zusatz

eines der Oligonukleotide in der Lage war, die λ -DNA vollständig zu methylieren und somit vor dem Verdau zu schützen (Abb. 5.16 *Spuren 7*).

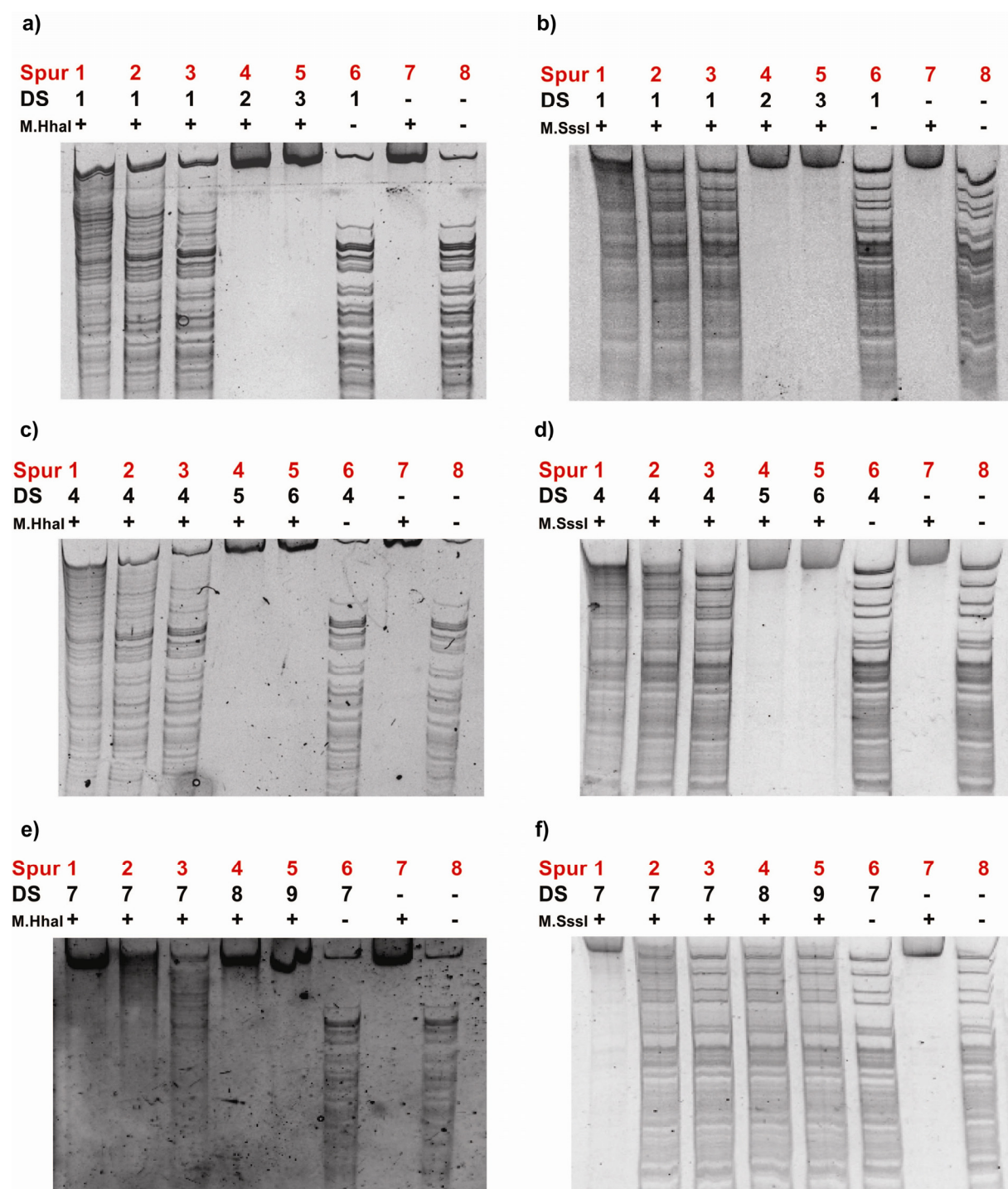


Abbildung 5.16 Restriktions-Schutzassays der bakteriellen Methyltransferasen M.HhaI (a), c) und e)) und M.SssI (b), d) und f)): Die Fluoreszenzdetektion der λ -DNA erfolgte nach Färbung der Polyacrylamidgele mit SYBR Green II. DNA-Leitern bedeuten eine positive Restriktionsreaktion. Spuren 1: 4.0 pmol, Spuren 2: 8.0 pmol, Spuren 3: 16 pmol Inhibitor; Spuren 4 und 5: 16 pmol Kontrollstränge.

Zuletzt musste die Aktivität des Restriktionsenzym getestet werden. Dabei wurde λ -DNA ohne Zugabe von Inhibitor und Methylase durch die Endonuklease verdaut (Abb. 5.16 *Spuren 8*).

Die Inhibitoren **DS1** und **DS4** waren bereits in substöchiometrischen Mengen in der Lage, beide Methyltransferasen zu einem gewissen Grad zu hemmen, wenn auch nicht vollständig (Abb. 5.16 a)–d) *Spuren 1*). Dies manifestiert sich dadurch, dass auf dem Gel im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 5.16 a)–d) *Spuren 6 und 8*) immer noch mehrere langsamer laufende, also nicht geschnittene, längere DNA-Stränge zu sehen sind. Sobald die Duplexe **DS1** und **DS4** in stöchiometrischen Mengen oder im Überschuss zugegeben wurden, waren die Muster des λ -DNA-Verdaus nahezu identisch mit denen der Kontrollen, sodass man von einer vollständigen Inhibition der Methyltransferasen sprechen kann (Abb. 5.16 a)–d) *Spuren 2 und 3*). Die Kontrollstränge **DS2**, **DS3**, **DS5** und **DS6** hatten trotz des Einsatzes von zwei Äquivalenten keinen Einfluss auf die Methylierungsaktivität (Abb. 5.16 a)–d) *Spuren 4 und 5*). Anders sieht das Bild beim Einsatz der Stränge **DS7–9** aus. Während **DS7** im Zuge einer substöchiometrischen und stöchiometrischen Zugabe überhaupt keinen Einfluss auf die Aktivität von M.HhaI nahm und selbst bei doppelter Konzentration die Methylierung der λ -DNA nur unwesentlich einschränkte (Abb. 5.16 e) *Spuren 1, 2 und 3*), wurde die Methyltransferase M.SssI bereits bei stöchiometrischem Einsatz von **DS7** nahezu vollständig inaktiviert (Abb. 5.16 f), *Spuren 1, 2 und 3*). Die Kontrollen **DS8** und **DS9** konnten M.HhaI nicht hemmen (Abb. 5.16 e), *Spuren 4 und 5*), führten aber zu einer kompletten Inhibition der Methylase M.SssI (Abb. 5.16 f), *Spuren 4 und 5*).

Zusammenfassend ist zu konstatieren, dass die Ergebnisse der EMSA-Experimente mit den Strängen **DS1–9** mit der bakteriellen Methyltransferase M.HhaI sehr gut durch die Restriktions-Schutzassays bestätigt werden konnten. Die dC^F-haltigen Duplexe **DS1** (normales Phosphordiesterückgrat) und **DS4** (Halbstrang mit Phosphorothioatrückgrat) waren sehr gute Inhibitoren. Dagegen war **DS7** (mit komplettem Phosphorothioatrückgrat), der nur einen sehr schwachen Komplex mit M.HhaI bildete (vgl. Kapitel 5.1.5.3), als Suizidsubstrat ungeeignet. Im Falle der Methylase M.SssI stimmten die Ergebnisse der Restriktions-Schutzassays nicht vollständig mit den Aussagen der EMSA-Experimente überein: **DS1** und **DS4** erwiesen sich als sehr gute Inhibitoren, aber **DS7**, der – wie mit M.HhaI – mit M.SssI ebenfalls einen nur sehr schwach fluoreszenten Komplex ausbildete, konnte das

Enzym bereits bei stöchiometrischem Einsatz komplett inhibieren. Auch die Kontrollstränge **DS8** und **DS9** konnten die Methylierung durch M.SssI unterbinden, was wiederum sehr gut mit den erhaltenen Banden der EMS-Assays übereinstimmte und die stark unspezifische Bindung von M.SssI an die doppelsträngigen Phosphorothioate **DS7–9** bestätigte.

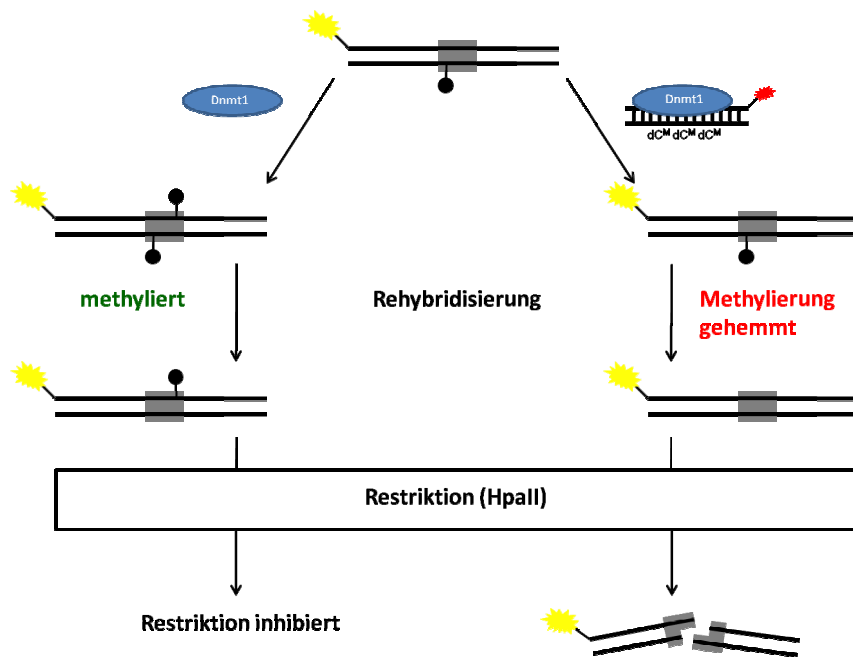
Humane Methyltransferase DNMT1

Aktivitäts-Assays mit der humanen Methyltransferase DNMT1 beinhalten meistens den Einsatz von Tritium-markiertem SAM. Nach der Methylierung eines hemimethylierten DNA-Strangs wird die Menge an übertragenem $\text{CH}_2(^3\text{H})^+$ durch Messung der Radioaktivität bestimmt.^[77, 101, 359] Diese Methode erfordert allerdings die entsprechende Infrastruktur (Radiolabor und Szintillator) und konnte daher nicht genutzt werden.

Da DNMT1 hemimethylierte DNA als Substrat benötigt, war der Einsatz von λ -DNA, wie bei den bakteriellen Methylasen, nicht mehr möglich. Aus diesem Grund wurde ein Ansatz von *Valinluck* verwendet, der von *D. Kuch* kürzlich zur Untersuchung der *Dumbbell*-Inhibitoren modifiziert wurde.^[191, 306] Der Assay ist in Schema 5.6 dargestellt.

Hierbei wurde ein hemimethylierter 31mer-Doppelstrang (**DS31**) eingesetzt, wobei der nicht methylierte Halbstrang eine Fluoreszenzmarkierung trug. Nach der Methylierungsreaktion wurde ein 250facher Überschuss des komplementären, nicht methylierten Gegenstrangs (**S10**) zugegeben und rehybridisiert. Bei zuvor erfolgter Methylierung erhielt man nun einen hemimethylierten Doppelstrang, andernfalls trug die rehybridisierte DNA keinen Methylrest. Im ersten Fall konnte der Strang anschließend nicht mehr durch das methylierungssensitive Restriktionsenzym HpaII (5'-C'CGG-3') geschnitten werden, da dieses bereits durch eine Hemimethylierung der Erkennungssequenz blockiert wird. Wurde DNMT1 dagegen gehemmt und konnte **DS31** nicht methylieren, kam es zum Restriktionsverdau.

a)



b)

DS30: 5'-GAAGCTGGGACTTCCCGGGAGGAGAGTGCAA-FI-3'
 3'-CTTCGACCCTGAAGGGXCTCCTCTCACGTT-5'
 X = dC^M FI = Fluorescein
S10: 3'-CTTCGACCCTGAAGGGCCCTCCTCTCACGTT-5'

Schema 5.6 a) Restriktions-Schutzassay zur Prüfung der Aktivität der DNA-Doppelstränge **DS1–9** für die humane Methyltransferase DNMT1. Bei einem aktiven Enzym erhält man nach Rehybridisierung einen hemimethylierten Strang, der von HpaII nicht mehr geschnitten werden kann (links). Die erfolgreiche Inhibierung der Methylase durch Inhibitor-DNA führt hingegen zum Restriktionsverdau des Test-Strangs (rechts). *Grau:* HpaII Erkennungssequenz; *schwarze Kreise:* dC^M; *gelber Stern:* Fluorescein. **b)** Sequenzen der eingesetzten Substrat-DNA.

Abbildung 5.17 zeigt das Polyacrylamidgel der Restriktions-Schutzassays der humanen Methyltransferase mit den DNA-Strängen **DS1–9**. Zur Auswertung der Ergebnisse wurde das Gel für 1 s (Abb. 5.17 oben) und 5 s (Abb. 5.17 unten) belichtet und die Fluoreszenz detektiert. Die gewonnenen Daten wurden mit der Kontrolle (*Spur 10*) verglichen. Hier entspricht die obere fluoreszente Bande der Menge an Substratstrang **DS31** die DNMT1 methylieren und so vor dem Restriktionsverdau schützen konnte.

Die beiden anderen Kontrollexperimente zeigen die vollständige Restriktionsreaktion von HpaII und **DS31** ohne Zusatz von Inhibitorstrang und DNMT1 (*Spur 11*) und dass die Anwesenheit des Inhibitor-Duplexes ohne Zusatz von DNMT1 die Restriktionsreaktion von HpaII nicht beeinflusste (*Spur 12*).

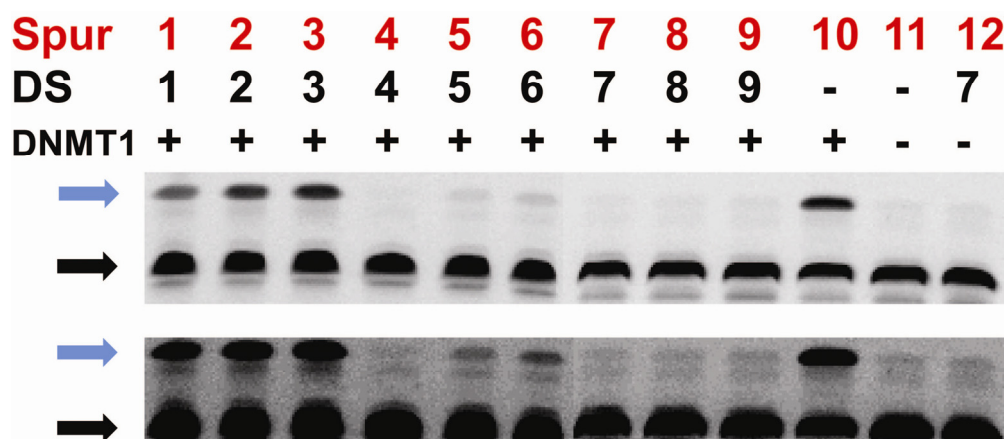


Abbildung 5.17 Fluoreszenzdetektion des Polyacrylamidgels des Restriktions-Schutzassays der humanen Methyltransferase DNMT1. Belichtungszeit 1 s (oben) und 5 s (unten). *Blaue Pfeile: DS31 ungeschnitten; Schwarze Pfeile: DS31 geschnitten.*

In Übereinstimmung mit der schwachen Bande des EMS-Assays zeigte sich der hemmende Effekt von **DS1** auf die Methylierungsaktivität von DNMT1 nur in sehr geringer Ausprägung. Dies ist an der etwas schwächeren Fluoreszenzbande des ungeschnittenen Stranges **DS31** in *Spur 1* im Vergleich zu den *Spuren 2* und *3* zu erkennen. **DS2** und **DS3** offenbarten keine offensichtliche Inhibition von DNMT1. Wurde ein Phosphordiesterstrang des Duplexes durch einen Phosphorothioatstrang ersetzt, führte das zu einer nahezu vollständigen Blockade der Methylierungsreaktion (*Spuren 4, 5 und 6 oben*). Nur sehr schwache Fluoreszenzbanden wurden für **DS5** und **DS6** detektiert, wobei **DS5** eine geringfügig höhere inhibierende Wirkung zeigte, was daran lag, dass der Duplex die hemimethylierte Erkennungssequenz besaß (*Spuren 5 und 6 unten*). Der Strang **DS4**, der dC^F und einen Phosphorothioatstrang enthielt, konnte die Methylierung durch DNMT1 vollständig hemmen (*Spur 4 unten*). Verantwortlich für diesen starken Effekt war die Kombination von dC^F und Phosphorothioatmodifikation. Genauso inhibierten der Doppelstrang **DS7**, der dC^F und ein vollständiges Phosphorothioatrückgrat besaß, sowie die beiden zugehörigen Kontrollstränge **DS8** und **DS9** die Methyltransferase komplett (*Spuren 7, 8 und 9*).

Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den aus den EMS-Experimenten erhaltenen Daten.

An Hand der Ergebnisse der *in vitro*-Experimente konnten die DNA-Stränge **DS4** und die Stränge **DS7**, **DS8** und **DS9** als Inhibitoren der humanen Methyltransferase DNMT1 identifiziert werden. Die Daten für **DS10** und **HP1** wurden nicht gezeigt, da sie identisch mit den Daten sind, die für ihre jeweiligen Prototypen **DS4** und **DS7** erhalten wurden. Die nächsten Experimente sollten nun auf lebende Zellen ausgeweitet werden.

5.1.6 *In vitro*-Untersuchungen II: Zellstudien

Um die Wirkung der DNA-Duplexe in lebenden, humanen Zellen zu testen, sollten die Stränge mit Hilfe eines Transfektionsmittels in HCT116-Darmtumorzellen eingeschleust werden. Durch konfokale *laser-scanning* Mikroskopie sollte überprüft werden, dass die Doppelstränge nicht nur in die Zellen aufgenommen werden, sondern auch in den Zellkern gelangen, um das Zielprotein DNMT1 adressieren zu können. In Zusammenarbeit mit *L.Schermelleh* (Arbeitsgruppe *Leonhardt*)^[360] sollte außerdem versucht werden, die Wechselwirkung der Inhibitoren mit DNMT1 direkt im Zellkern durch konfokale Fluoreszenzspektroskopie zu verfolgen. Anschließend sollte ermittelt werden, ob die Konstrukte Auswirkungen auf den genomischen Methylierungsstatus haben.

5.1.6.1 Transfektion der Doppelstränge in HCT116-Darmtumorzellen und Kolokalisationsexperimente

Die Methyltransferase DNMT1 befindet sich während der S-Phase von Zellen an Stellen aktiver Replikation, also im Zellkern, um das Methylierungsmuster der genomischen DNA aufrecht zu erhalten.^[79, 91] Damit die Inhibitoren die Methyltransferase blockieren können, müssen diese in den Zellkern gelangen. Dazu müssen sie zuerst mit Hilfe eines Transfektionsmittels in die Zellen eingeschleust werden.

Die *Dumbbell*-Konstrukte von *D. Kuch* konnten erfolgreich mit dem kationischen Lipid Transfectin (*Fa. Bio-Rad*) in die Darmkrebszellen eingebracht werden, weshalb dieses Transfektionsmittel auch für die Doppelstränge **DS1–10** und die Haarnadel

HP1 verwendet wurde.^[306, 361] Die Zellen wurden über Nacht (ca. 16 h) mit der Transfektionslösung inkubiert und anschließend mit frischem Medium versorgt. Die Verteilung der Doppelstränge wurde nach 24 h durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Die Lokalisation im Zellkern wurde allerdings nur für die DNA-Duplexe **DS7**, **DS8** und **DS9** sowie die Haarnadel **HP1** beobachtet (Abb. 5.18 e) - h)). Alle anderen Doppelstränge konzentrierten sich, wenn sie in die Zelle aufgenommen wurden, im Zytoplasma und nicht genauer bestimmten Zellorganellen (Abb. 5.18 a) - d)).

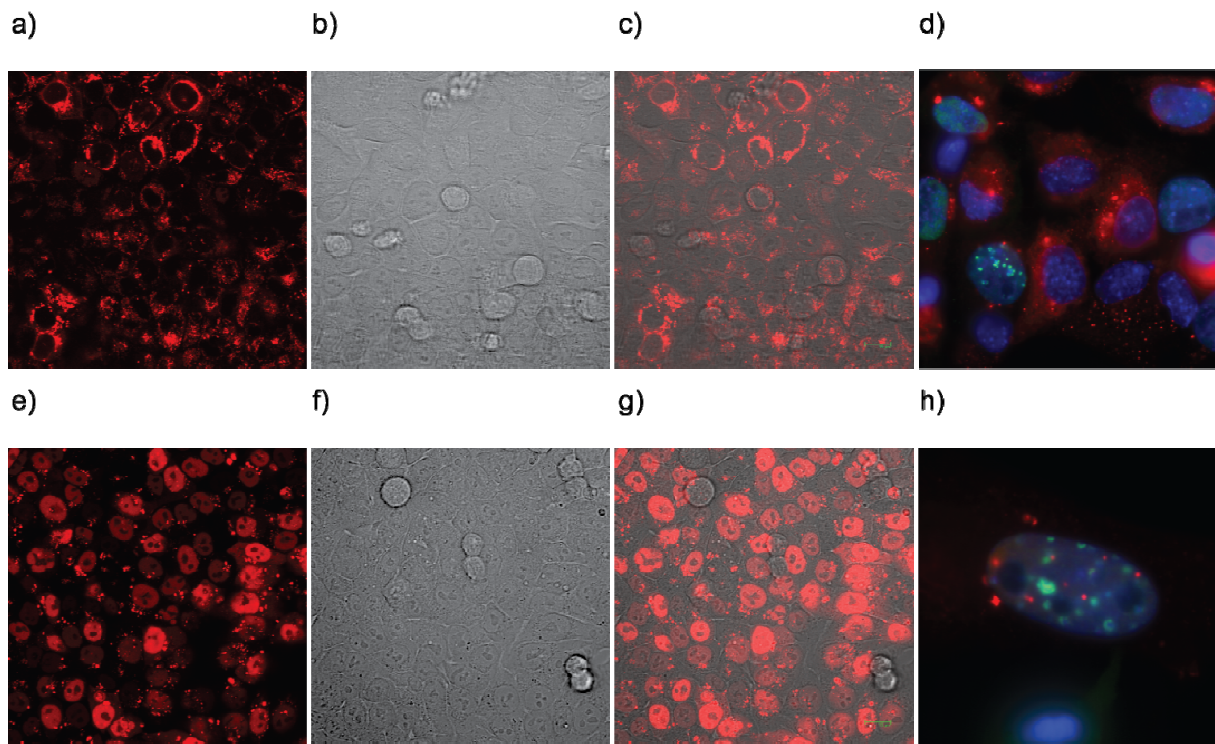


Abbildung 5.18 Transfektion der Doppelstränge **DS1–10** und **HP1** in humane HCT116-Darmtumorzellen. 1 μ M DNA wurde in einem Volumen von 1 mL mit 10 μ L Transfectin 30 min bei RT inkubiert und dann zu den Zellen in 5 mL Medium gegeben. Nach Inkubation über Nacht wurde das Medium gewechselt und die Transfektion durch Fluoreszenzmikroskopie kontrolliert. **a)** und **e)** Cy3-Kanal; **b)** und **f)** Durchlichtkanal; **c)** und **g)** Überlagerung von Cy3- und Durchlichtkanal; **d)** und **h)** Bilder der Kolokalisationsstudien; Aufnahmen **a)–d)** zeigen die Bilder der Transfektionen mit **DS1–6** und **DS10**; **e)–h)** die Bilder von **DS7–9** und **HP1**.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt wurde, sollte durch die zusätzliche Modifikation von **DS4** mit einem lipophilen Cholesterol-Rest überprüft werden, ob dieser DNA-Strang (**DS10**) nun in der Lage war, nach seiner Transfektion bis in den Zellkern

vorzudringen. Die Lokalisation von **DS10** im Zellkern konnte allerdings nicht bestätigt werden.

Um die Interaktion der DNA-Stränge mit DNMT1 in einer Säugetierzelle untersuchen zu können, wurden die Stränge **DS1–10** und **HP1** von *L. Schermelleh* (Arbeitskreis Leonhardt)^[360] in C2C12 Mäusemyoblasten transfiziert. Die humane Methyltransferase DNMT1 und die von Mäusen sind sich sehr ähnlich.^[63, 77] Nur die vier DNA-Duplexe **DS7–9** und **HP1** konnten nach der Transfektion mit HiPerFect (*Qiagen*) durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie im Zellkern lokalisiert werden (Abb. 5.18 h) und Abb. 5.19).

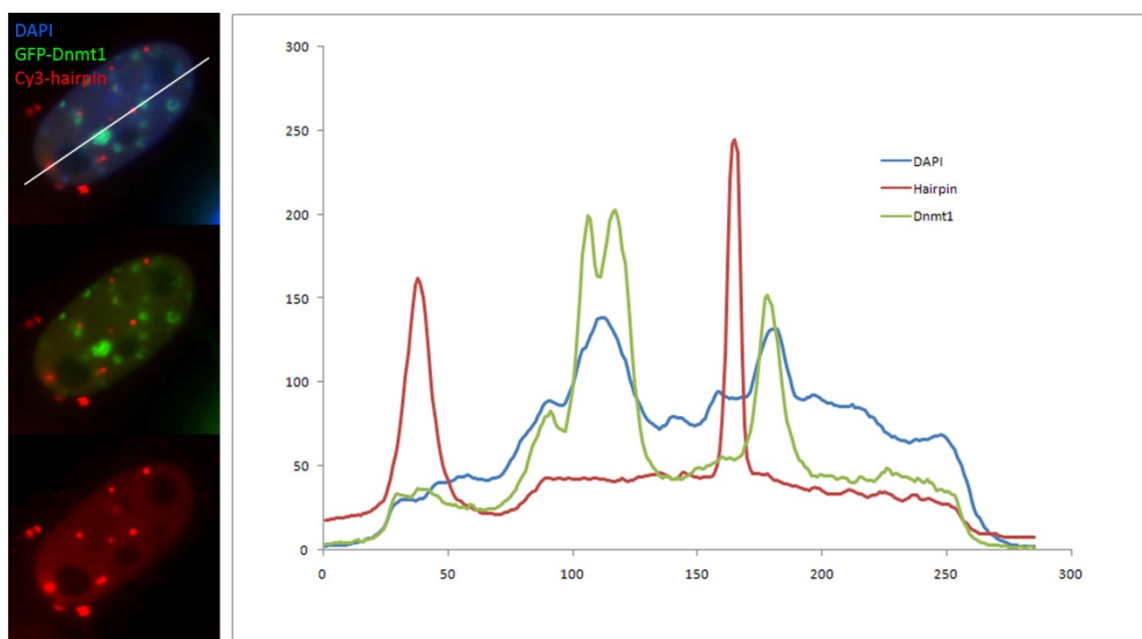


Abbildung 5.19 Transfektion von **HP1** (rot) in C2C12-Mäusemyoblasten. Nach Fixieren der Zellen mit Formaldehyd wurde endogenes DNMT1 mit spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht (grün) und DNA mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol, blau) gefärbt. Entlang der weißen Linie wurde das Fluoreszenzdiagramm (rechts) aufgenommen. Die Intensitätsmaxima von DNA und DNMT1 kommen übereinander zu liegen und markieren Stellen aktiver Replikation. **HP1** zeigt keine Kolokalisation mit diesen Bereichen.

Ebenso wie bei den *Dumbbells* konnte auch hier keine offensichtliche Toxizität festgestellt werden.^[306] Nach 16 h wurde die endogene DNMT1 der Mäusezellen mit spezifischen Antikörpern gefärbt. Im Falle der *Dumbbells* konnte *Kuch* beobachten, wie nur der aktive *Dumbbell* mit dem Inhibitor dC^N in S-Phasenzellen mit DNMT1 an Stellen aktiver Replikation kolokalisiert (vgl. Abb. 5.2), während die Kontrollstränge

diffus über den Zellkern verteilt blieben. Im Gegensatz dazu zeigten hier sowohl die Kontrollstränge **DS8** und **DS9**, als auch die aktiven Stränge **DS7** und **HP1** keine Kolokalisation mit der Methylase.

In Abbildung 5.19 ist die Fluoreszenzfärbung einer mit der Haarnadel **HP1** transfizierten C2C12-Mäusezelle gezeigt. Die Stellen, an denen sich **HP1** konzentriert, (rote Fluoreszenz) stimmen nicht mit den Stellen aktiver Replikation überein (blaue und grüne Fluoreszenz).

Trotz dieses ernüchternden Ergebnisses sollte in einem abschließenden Experiment untersucht werden, ob sich die Aktivität von DNMT1 in lebenden Zellen durch Anwendung der Inhibitorstränge über einen längeren Zeitraum herabsetzen lässt und somit der globale Methylierungsgrad gesenkt werden kann.

5.1.6.2 Auswirkung der Doppelstränge **DS7–9** und **HP1** auf den globalen genomischen Methylierungsgrad von HCT116-Zellen

Da die Inhibitoren **DS7–9** und **HP1** keine Kolokalisation mit DNMT1 im angegebenen Zeitrahmen von 16 h zeigten, sollte nun getestet werden, ob nach mehrfacher Transfektion der Inhibitorstränge in HCT116-Darmtumorzellen über einen Zeitraum von mehreren Tagen ein Einfluss auf die Aktivität von DNMT1 festgestellt werden kann. Durch Suizidinhibitoren wie dC^N ist es möglich, DNMT1 zu blockieren und so den Gehalt an dC^M im Genom von Säugetierzellen im Verlauf mehrerer Replikationszyklen drastisch zu senken (vgl. Kapitel 3.5). Diese passive Demethylierung findet unter anderem auch in den hypermethylierten Promotorregionen von inaktivierten Genen statt und führt als Folge zu deren Reexpression. Lokale Veränderungen im Methylierungsmuster sind allerdings nur durch sehr aufwändige Methoden, wie methylierungsspezifische PCR, erkennbar.^[362] Einfacher ist es hingegen, die Gesamtmenge an dC^M im Genom (globaler genomischer Methylierungsgrad) zu bestimmen.^[363] Die meisten analytischen Methoden basieren auf dem vollständigen Verdau der genomischen DNA und der nachfolgenden Quantifizierung der erhaltenen Bausteine. Durch chemische oder enzymatische Behandlung der DNA wird diese bis zu den Nukleosid-Monophosphaten oder den reinen Nukleosiden abgebaut, die dann mit Hilfe von Kapillarelektrophorese (CE) oder HPL-chromatographisch aufgetrennt und quantifiziert werden können.^[364-371]

In dieser Arbeit sollte die DNA enzymatisch zu den freien Nukleosiden abgebaut und anschließend per HPLC quantifiziert werden, da diese Methode bereits erfolgreich angewendet werden konnte und reproduzierbare Ergebnisse lieferte.^[306] Hierbei musste die zusammen mit der DNA extrahierte RNA möglichst komplett entfernt werden, da zu intensive Signale der freien Ribonukleoside im HPLC-Spektrum eine exakte Quantifizierung des dC^M-Gehalts unmöglich machten. Im HPLC-Chromatogramm überlagerten sich die Signale von Uridin und 2'-Desoxycytidin und verfälschten somit die Integrale und folglich die berechneten Werte für den Gehalt an dC^M. War eine signifikante Menge an Uridin vorhanden, verschob sich das Absorptionsmaximum des 2'-Desoxycytidins von 271 nm zu kürzeren Wellenlängen ($\lambda_{\text{max}}(\text{Uridin}) = 261 \text{ nm}$), was mit Hilfe eines *photodiodearray*-Detektors und der Aufnahme von 3D-Spektren überprüft werden konnte. Deshalb wurde die Probe zweimal mit RNase behandelt. Dies erfolgte im ersten Fall während der Aufreinigung des Zelllysats mit dem Extraktionskit (*Qiagen*), ein weiteres Mal nach der Extraktion. Die DNA wurde anschließend durch Ethanolfällung und Behandlung mit Gelfiltrationssäulen (Biospin 6, *Bio-Rad*) sorgfältig gereinigt und konnte auf diese Weise nahezu quantitativ von Ribonukleotiden/-nukleosiden befreit werden. Geringe Mengen an Ribonukleosiden störten bei der Auswertung allerdings nicht.

Der Verdau der DNA und die Detektion der erhaltenen Nukleoside per *reversed phase*-HPLC erfolgte nach einer leicht modifizierten Methode von *Crain* und *Song*.^[369, 372] Dabei wurde die extrahierte DNA durch Nuklease P1, Schlangengift-Phosphodiesterase I und *Antarctic*-Phosphatase vollständig abgebaut. Die Detektion und Integration der Nukleosidsignale durch HPLC musste bei einer Wellenlänge von 278 nm durchgeführt werden, da dC und dC^M nur bei dieser Wellenlänge den gleichen Absorptionskoeffizienten haben und direkt miteinander verglichen werden können. Der Verdau von 3 µg genomischer DNA lieferte ausreichend starke Signale von dC^M für eine zuverlässige Auswertung, wie in Abbildung 5.20 gezeigt. Die Zuordnung der Signale wurde durch Verwendung eines *photodiodearray*-Detektors gewährleistet. Vor jeder Verdau-Serie wurde ein Chromatogramm einer Standardlösung der fünf Basen aufgenommen, um eine einwandfreie Trennleistung des verwendeten Systems sicherzustellen.

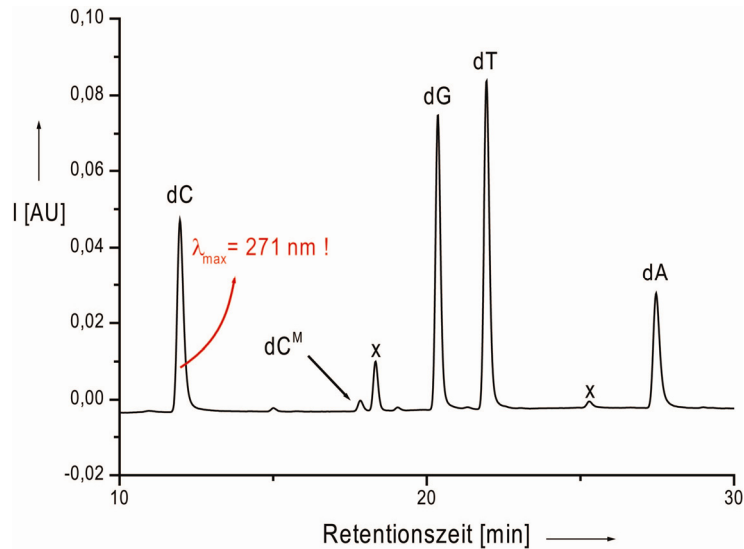


Abbildung 5.20 HPL-Chromatogramm des Totalverdaus von 3 µg genomischer DNA aus HCT116-Darmtumorzellen. In Abwesenheit von U ist das für dC Signal charakteristische Absorptionsmaximum von 271 nm zu finden. Puffer A: 0.1 M TEAA in H₂O; Puffer B: 0.1 M TEAA in 20 % H₂O/80 % MeCN; 0 → 20 % B in 30 min; Nucleodur 100-3 C18 Säule. Aufgenommen bei λ = 278 nm. X = RNA Reste, die hier aber bei der Auswertung nicht stören.

Um die Wirkung der Doppelstränge **DS7–9** und **HP1** auf den Methylierungsgrad zu untersuchen, wurden sie, wie bereits in Kapitel 5.1.6.1 beschrieben, in HCT116-Zellen transfiziert und die genomische DNA anschließend verdaut und analysiert. In einem ersten Versuch wurden die Zellen mit den oben genannten DNA-Strängen an den Tagen 2, 4 und 7 transfiziert und an Tag 9 lysiert. An Tag 5 hatten alle Proben eine Zelldichte von etwa 90 % erreicht und wurden passagiert (in der Regel 1:20). Im Vergleich zu den Kontrollen, bei denen die Zellen nicht, oder nur mit Transfektin behandelt wurden, konnte nach Aufarbeitung und HPLC-Analyse keine Senkung des dC^M-Gehalts festgestellt werden. Die erhaltenen Werte stimmten sehr genau mit dem Sollwert für diese Zelllinie von etwa 4.5 % überein. Der dC^M-Gehalt wird dabei prozentual bezogen auf die Gesamtmenge an dC in der DNA wie folgt definiert:

$$\text{dC}^{\text{M}} [\%] = \frac{A(\text{dC}^{\text{M}})}{A(\text{dC}^{\text{M}}) + A(\text{dC})} \times 100$$

Gleichung 5.1 Berechnung des dC^M-Gehalts der verdauten genomischen DNA. *A* = Integral des Signals im HPL-Chromatogramm.

Die *Dumbbell*-Konstrukte von *D. Kuch* zeigten eine detektierbare Senkung des Methylierungsgrades erst nach dreimaliger Transfektion über einen Zeitraum von zwei Wochen. Daher wurden die HCT116-Darmtumorzellen in einem letzten Versuch fünf Mal, an den Tagen 2, 4, 7, 11 und 13 mit den DNA-Strängen transfiziert und an Tag 15 lysiert. Die Passagen erfolgten an den Tagen 5 und 9. Doch auch hier konnte nach Aufarbeitung und Analyse keine erkennbare Wirkung der Inhibitorstränge auf die humane Methyltransferase DNMT1 und somit auf den Gehalt an dC^M im Genom festgestellt werden.

5.1.7 Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick

Die Regulation der Genexpression auf epigenetischer Ebene wird vor allem durch die Cytosin-C5-DNA-Methylierung und die Modifikation der Histone gesteuert. Störungen dieser eng miteinander verknüpften Mechanismen können schwerwiegende Krankheiten wie Krebs zur Folge haben. So wird in Tumorzellen ein – verglichen mit gesunden Zellen – reduzierter globaler Methylierungsgrad der genomischen DNA beobachtet, während eine lokale Hypermethylierung vor allem in CpG-reichen Promotorregionen zur Inaktivierung wichtiger Tumorsuppressorgene (wie z. B. *p53*) führt. Auf der Suche nach therapeutischen Maßnahmen gegen Krankheiten, die durch solche Störungen hervorgerufen werden, wurden Werkzeuge entwickelt, die es ermöglichen, auf die zelluläre Methylierungsmaschinerie Einfluss zu nehmen. Hierbei kamen bereits verschiedene Nukleosidinhibitoren, *antisense*-Oligonukleotide u. a. (vgl. Kapitel 3.5) zur Anwendung, um über die entsprechende Methyltransferase die DNA-Methylierung zu regulieren.^[156, 210-212, 219, 220]

Um neue, durch chemische Synthese leicht zugängliche Inhibitoren für die humane Methyltransferase DNMT1 zu entwickeln, wurden in dieser Arbeit kurze, doppelsträngige Oligonukleotide synthetisiert, welche eine hemimethylierte CpG-Zielsequenz und darin enthalten das Suizidsubstrat dC^F trugen. Zuerst wurde das ungeschützte dC^F-Phosphoramidit **11** synthetisiert und in DNA-Stränge eingebaut, was zwar bei einer einfachen Kupplung gelang, bei dreifachem Einbau allerdings zu einem untrennbaren Gemisch verschiedener DNA-Stränge führte, welche sehr wahrscheinlich durch Nebenreaktionen der freien Aminogruppe von dC^F entstanden sind. Mit Hilfe des dC^F-Vorläufers **10** konnte dieses Problem schließlich gelöst werden. Damit eine erhöhte Resistenz dieser DNA-Konstrukte gegen Nukleasen

gewährleistet werden konnte, wurde das Phosphordiesterückgrat unterschiedlich stark durch Phosphorothioate ersetzt.^[373]

Nach der Synthese und Charakterisierung der mit einem Cy3-Fluoreszenzlabel ausgestatteten Inhibitorstränge **DS1**, **DS4**, **DS7**, **DS10** und **HP1** und deren Kontrollen **DS2**, **DS3**, **DS5**, **DS6**, **DS8** und **DS9**, wurde ihre hemmende Wirkung auf die bakteriellen Methyltransferasen M.HhaI und M.SssI sowie die humane Methyltransferase DNMT1 bestimmt. Durch EMS- und Restriktions-Schutzassays konnte gezeigt werden, dass es zum Einen zur Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen den Methyltransferasen und dem modifizierten Nukleosid **7** der aktiven Inhibitorstränge kam und dass zum Anderen der Grad an Rückgratmodifikation einen erheblichen Einfluss auf die Bindungsaffinität der Enzyme zu den Doppelsträngen hatte. Besonders auffällig war, dass sich die humane Methyltransferase mit allen drei vollständig modifizierten Phosphorothioaten **DS7–9** hemmen ließ, also auch mit den Kontrollsträngen ohne das Suizidsubstrat dC^F und ohne das hemimethylierte CpG-Motiv und **HP1**, sowie dem halbmodifizierten, aktiven Doppelstrang **DS4**. Dahingegen stellten **DS7–9** und **HP1** sehr schlechte Substrate für die bakteriellen Enzyme dar. Die Inhibierung gelang hier wesentlich besser mit **DS4** und dem am Rückgrat unmodifizierten Doppelstrang **DS1**.

Um den Effekt der Inhibitorstränge auf lebende Zellen zu untersuchen, wurden die Konstrukte in humane HCT116-Darmtumorzellen transfiziert. Allerdings konnten durch konfokale *laser-scanning*-Mikroskopie nur die Stränge **DS7–9** sowie der Hairpin **HP1** klar im Zellkern lokalisiert werden. Die anderen Substrate reicherteten sich an bzw. in nicht näher bestimmten Zellorganellen an. Auch eine zusätzliche Cholesterylfunktion (**DS10**) konnte keine Aufnahme in den Zellkern gewährleisten.

Die in Zusammenarbeit mit *L. Schermelleh* aus dem Arbeitskreis *Leonhardt* durchgeführten Kolokalisationsstudien verliefen negativ, d.h. es konnte keine Kolokalisation der humanen Methyltransferase mit den aktiven DNA-Doppelsträngen **DS7** und **HP1** beobachtet werden, wie es bei den aktiven *Dumbbells* von *D. Kuch* der Fall war. Mit hoher Wahrscheinlichkeit lag dies hauptsächlich an der sehr starken, unspezifischen Wechselwirkung vieler verschiedener Enzyme mit diesen Phosphorothioat-modifizierten DNA-Strängen.

Schließlich wurde die Auswirkung von **DS7–9** sowie **HP1** auf den globalen genomischen Methylierungsgrad der HCT116-Zellen untersucht, um festzustellen, ob eine mehrfache Anwendung der Substrate über einen Zeitraum von 15 Tagen zu

einem Effekt führte. Nach Isolation der DNA und deren Totalverdau konnte der Gesamtgehalt an dC^M mit Hilfe von HPL-Chromatographie bestimmt werden. Dieser war allerdings im Vergleich zu den Kontrollzellen unverändert, was die Ergebnisse aus den Kolokalisationsstudien bestätigte. In weiterführenden Studien müssten neben dem absoluten dC^M-Gehalt der genomischen DNA auch die lokalen Methylierungsmuster untersucht werden. Mittels methylierungsspezifischer PCR ist es möglich, den Methylierungsstatus bestimmter Genpromotoren vor und nach der Behandlung mit den Inhibitorsträngen zu ermitteln, denn auch wenn der Gehalt an dC^M insgesamt ungefähr gleich bleibt, könnte es zu lokalen Veränderungen und der Reexpression eines Tumorsuppressorgens kommen.

Die hier erhaltenen Daten zeigen, dass die vollständig zu Phosphorothioaten modifizierten DNA-Stränge **DS7–9** sowie **HP1** die humane Methyltransferase DNMT1 zwar in den *in vitro*-Studien vollständig hemmen, in lebenden Zellen aber das Zielprotein nicht mehr adressieren konnten.

Wesentlich selektiver war hingegen die Inhibition der nur zur Hälfte zu Phosphorothioaten umgewandelten Stränge **DS4–6**. Hier führte lediglich das aktive Konstrukt **DS4** zur vollständigen Inhibition. Auch die im Vergleich zu **DS7–9** wesentlich geringere unspezifische Wechselwirkung mit den Enzymen eines HCT116-Zelllysats macht diese Stränge zu vielversprechenderen Kandidaten für ihren Einsatz in lebenden Zellen, sofern es gelingt, diese in den Zellkern zu transfizieren.

Um dieses Ziel zu erreichen, müsste in weiterführenden Experimenten geprüft werden, wie sich entsprechende Haarnadelkonstrukte mit einem Phosphorothioat-Halbstrang verhalten. Können auch sie nicht in den Zellkern transfiziert werden, wäre eine weitere Modifikation mit geeigneten Transportergruppen, wie beispielsweise Oktaargininen, eine mögliche Lösung.

Schließlich wäre auch die Synthese von *Dumbbells* mit unterschiedlich starkem Anteil an Phosphorothioaten eine erfolgversprechende Alternative, vor allem wenn sich herausstellen sollte, dass der demethylierende Effekt der *Dumbbells* mit einem natürlichen Phosphordiesterrückgrat auf deren Zersetzung und dem Wiedereinbau des jeweiligen Suizidsubstrats in genomische DNA beruhen sollte. Ein Nachweis zu dem Wirkmechanismus kann erbracht werden, indem dC^N bzw. dC^F in die doppelten Haarnadeln eingebaut wird, allerdings nicht in einem CpG-Kontext. Diese Konstrukte

sollten nicht mit DNMT1 interagieren und daher keinen demethylierenden Effekt zur Folge haben. Da das Suizidsubstrat dC^F durch chemische Festphasensynthese in DNA-Stränge eingebaut werden kann, wäre ein Zugang zu solchen *Dumbbell*-Inhibitoren auch in einem größeren Maßstab gewährleistet.

Damit neuartige Inhibitoren mit bekannten Methoden zur Deaktivierung von DNMT1 konkurrieren können, wäre das Auftreten eines signifikanten demethylierenden Effekts in einem Zeitraum von maximal einer Woche wünschenswert. Die aktuell angewendeten siRNA- und *antisense*-Strategien benötigen in der Regel zehn oder mehr Tage, um das Protein auf nicht mehr nachweisbare Mengen zu reduzieren. Allerdings konnte die Methyltransferaseaktivität nicht vollständig ausgeschaltet, sondern nur um bis zu 90 % gesenkt werden.^[60, 211, 213, 218] Durch die Optimierung des Bindungsverhaltens gegenüber DNMT1 durch Änderung der Sequenzen und / oder der Länge der vorgestellten Konstrukte könnte der Wirkungsgrad möglicherweise erhöht werden. Beispielsweise könnten die CpG-Zielsequenzen durch mehrere Basenpaare voneinander getrennt werden, da DNMT1 vereinzelt Berichten zufolge zu diesen Motiven ein besseres Bindungsverhalten zeigt, als zu Tandem-d(CpG)-Einheiten.^[374]

Die durchgeführten Studien zeigen, dass es möglich ist, die humane Methyltransferase DNMT1 mit hochmodifizierten DNA-Doppelsträngen zu inhibieren. Für den Einsatz in lebenden Zellen müssen die hier getesteten Substrate allerdings noch weiter modifiziert oder mit dem bereits bestehenden *Dumbbell*-Design kombiniert werden, um das Enzym später auch *in vivo* adressieren zu können.

5.2 Carbozyklisches 5-Aza-2'-desoxycytidin: Ein Inhibitor der humanen Methyltransferase DNMT1?

5.2.1 Einleitung und Aufgabenstellung

Wie bereits in den vorangehenden Kapiteln detailliert geschildert, ist ein stark verändertes DNA-Methylierungsmuster ein Identifikationsmerkmal von Krebszellen im Vergleich zu gesunden Zellen. Die Hypermethylierung von Genpromotoren und die globale Hypomethylierung des Genoms verursachen die fehlerhafte transkriptionelle Inaktivierung von Genen sowie genomische Instabilität und tragen damit maßgeblich zur Initiierung, aber auch zur Aufrechterhaltung malignen Zellwachstums bei. Vor allem die Hypermethylierung stellt dabei aufgrund ihrer potenziellen Reversibilität ein geeignetes therapeutisches Ziel bei der Behandlung von Krebserkrankungen dar.^[19, 45, 46, 48, 59, 100, 293] Im Rahmen epigenetischer Therapieansätze wurde versucht, durch die Inhibierung der humanen Methyltransferase DNMT1 weitere schadhafte Methylierungsprozesse zu verhindern und die „gesunden“ Methylierungsmuster wiederherzustellen. Dabei wurden diverse demethylierende Substanzen gefunden, die das Wachstum von Tumoren hemmen und verschiedene für eine normale Zellfunktion essentielle Gene reaktivieren konnten.^[39, 44, 51, 100, 156, 194, 199, 233]

Der bislang effektivste bekannte DNMT1-Inhibitor ist das dC-Derivat 5-Aza-2'-desoxycytidin **5**, welcher allerdings einige signifikante Nachteile aufweist (vgl. Kapitel 3.5.2). Neben einer hohen Zytotoxizität zeigt die Substanz eine geringe Stabilität unter physiologischen Bedingungen.^[224, 254, 270, 273, 274, 298] Daher wurden in der Vergangenheit große Anstrengungen unternommen, um Alternativen mit günstigeren medizinalchemischen Eigenschaften zu finden, wobei das Hauptaugenmerk weiterhin auf der Entwicklung nukleosidischer Inhibitoren lag.^[39, 199]

Carbozyklische Nukleoside, bei denen das Sauerstoffatom im Zuckerring durch eine Methyleneinheit ersetzt wurde, sind im Allgemeinen stabiler gegenüber Hydrolyse als die natürlichen Nukleoside.^[375] In diesem Teil der Arbeit sollte zusammen mit A. Gégout das carbozyklische Analogon **15** der Inhibitorbase 5-Aza-2'-desoxycytidin (**5**) synthetisiert und nach Stabilitätstests ein möglicher demethylierender Effekt der neuen Substanz durch ihre Anwendung auf die humane Krebszelllinie HCT116

bestimmt sowie die Auswirkungen auf die Zellproliferation untersucht werden (Abb. 5.21).

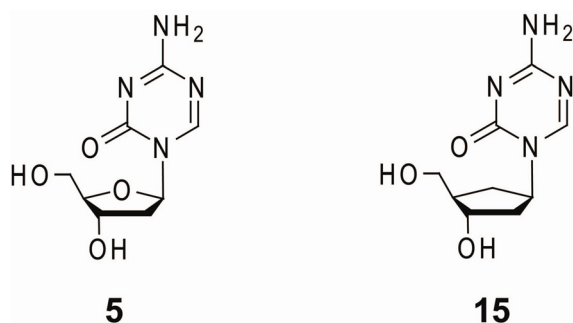
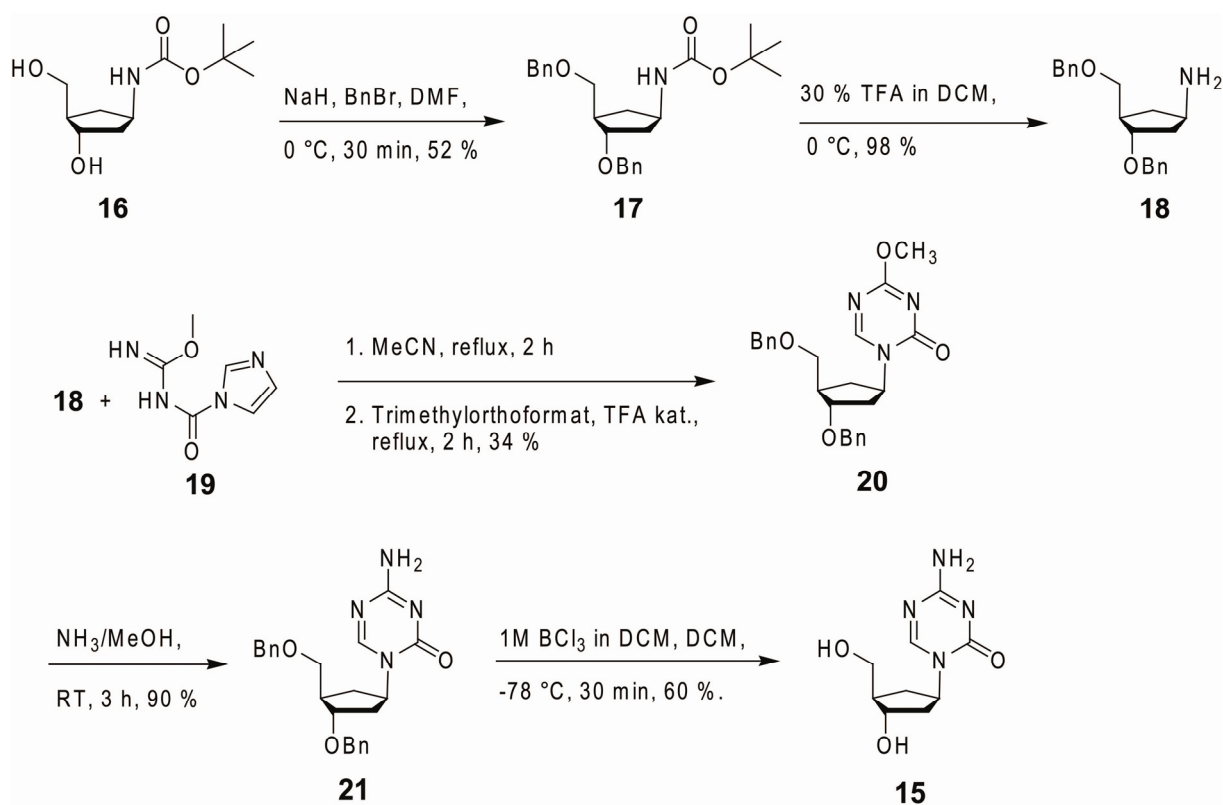


Abbildung 5.21 Der Methyltransferase-Inhibitor 5-Aza-2'-desoxycytidin (**5**, dC^N) und dessen carbozyklisches Analogon **15** (carbdC^N).

5.2.2 Synthese des carbozyklischen 5-Aza-2'-desoxycytidins (**15**)

Die Synthese von **15** wurde von A. Gégout durchgeführt und ist in Schema 5.7 dargestellt. Die experimentellen Daten sind im Anhang aufgeführt.

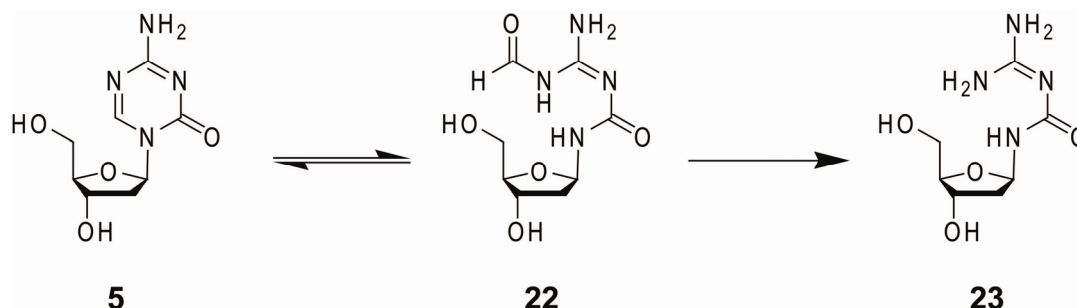


Schema 5.7 Synthese des carbozyklischen 5-Aza-2'-desoxycytidins **15**.

Zuerst wurde der Carbozyklus **16**, der nach einer Vorschrift von *Cullis et al.* synthetisiert wurde, Benzyl-geschützt und im Anschluss die BOC-Gruppe entfernt.^[376] Nun wurde in Anlehnung an *De Clercq et al.* das aus Carbonyldiimidazol und 2-Methylisoharnstoff hergestellte, stark elektrophile Methylisobiuret **19** mit dem Zyklopentanylammin **18** zum Triazin **20** umgesetzt.^[377] Nach Ammonolyse und Entschützung mit BCl_3 erhielt man das gewünschte Zielmolekül carbdC^{N} (**15**).

5.2.3 Stabilitätstests

Das Hauptproblem, das bei der klinischen Anwendung der DNMT1-Inhibitoren 5-Azacytidin **4** und 5-Aza-2'-desoxycytidin **5** entdeckt wurde, ist ihre geringe Stabilität in wässriger Lösung, was eine verringerte Wirksamkeit zur Folge hat. Außerdem können die bei der Zersetzung entstehenden Moleküle zu unerwünschten Nebenwirkungen führen.^[201] Die chemische Stabilität von 5-Azacytidin wurde erstmals 1965 von *Sorm et al.* untersucht.^[378] In alkalischer Lösung öffnet sich der Triazinring und unter Verlust einer Formylgruppe entsteht 1- β -D-ribofuranosyl-3-guanylharnstoff. Das Intermediat *N*-(formylamidino)-*N'*- β -D-ribofuranosylharnstoff wurde 1978 von *Beisler* beschrieben.^[272] *Rivard et al.* studierten die chemische Stabilität von 5-Aza-2'-desoxycytidin und stellten dabei fest, dass die Zersetzung von **5** in alkalischer Lösung identisch mit der von **4** war.^[273] Dabei kommt es zu einer reversiblen Öffnung des Triazinringes von **5** zu *N*-(formylamidino)-*N'*- β -D-2'-desoxyribofuranosylharnstoff **22**, welcher irreversibel zu 1- β -D-2'-desoxyribofuranosyl-3-guanylharnstoff **23** zerfällt (Schema 5.8).



Schema 5.8 Chemische Zersetzung von 5-Aza-2'-desoxycytidin (**5**) in alkalischer Lösung.

Im Folgenden wurde die chemische Stabilität von **15** in alkalischer, neutraler und saurer Lösung mit Hilfe von ^1H -NMR-Spektroskopie und HPLC-ESI-Spektrometrie analysiert und mit der Stabilität von kommerziell erhältlichem 5-Aza-2'-desoxycytidin (**5**) verglichen (Abbildung 5.22).

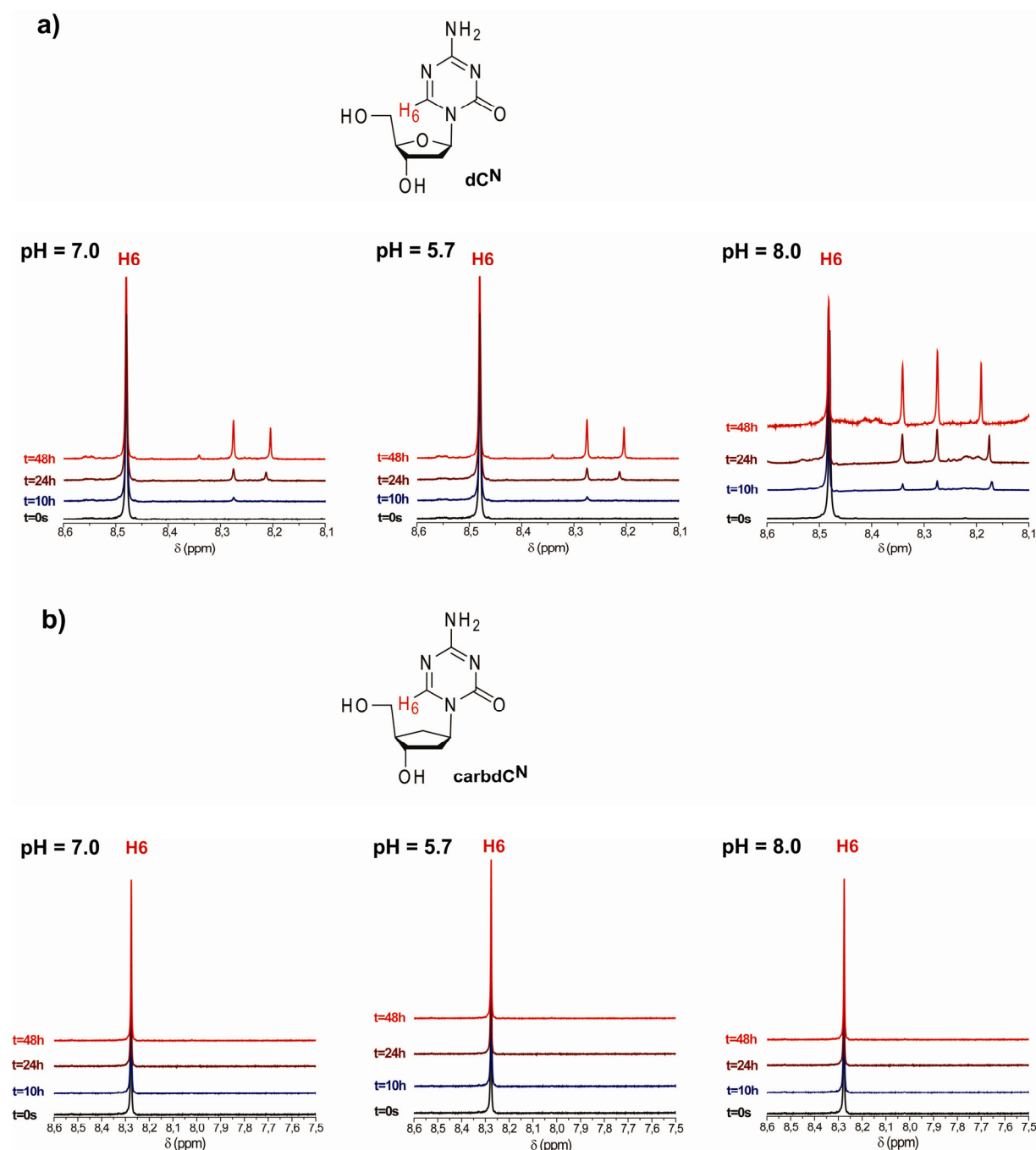


Abbildung 5.22 a) Tieffeld ^1H -NMR-Spektren von dC^{N} (**5**) und **b)** carbdC^{N} (**15**) in $\text{DMSO-}d_6$. **5** bzw. **15** (je 20 mM) wurden in Wasser (pH 7) und Phosphatpuffer (pH 5.7 und 8.0) gelöst und für 0, 10, 24 und 48 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen lyophilisiert und analysiert. Der *peak* H6 entspricht dem aromatischen Proton von **5** bzw. **15**.

Dazu wurden die beiden Substanzen in wässrigen Lösungen mit pH 5.7, 7.0 und 8.0 für 10 h, 24 h und 48 h inkubiert und anschließend lyophilisiert. Die Region zwischen $\delta = 7.5$ ppm und $\delta = 8.6$ ppm der NMR-Spektren der Verbindungen **5** und **15** zeigten dabei charakteristische Unterschiede. Zum Zeitpunkt $t = 0$ erhielt man für das aromatische Proton H6 ein scharfes Singulett bei $\delta = 8.48$ ppm für **5** (Abb. 5.22 a)) und $\delta = 8.28$ ppm für **15** (Abb. 5.22 b)). Bereits nach 10 h Inkubation bei pH 5.7, 7.0 und 8.0 erschienen zusätzliche Singuletts im NMR-Spektrum von dC^N , welche von der beginnenden Zersetzung des Nukleosids herrühren. Nach 48 h war ein starker Anstieg der Zersetzungsprodukte zu beobachten, was durch drei intensive, gut voneinander zu unterscheidende *peaks* bei $\delta = 8.21$, 8.27 und 8.34 ppm ersichtlich wurde (Abb. 5.22 a)). Im Gegensatz dazu zeigte das carbozyklische Analogon $carbdC^N$ auch nach 48 h bei allen drei pH-Werten keine Zersetzungserscheinungen. Lediglich das Singulett des aromatischen Protons H6 war erkennbar (Abb. 5.22 b)).

Im Folgenden wurden HPLC-ESI-Experimente durchgeführt, um die durch Hydrolyse entstandenen Zersetzungsprodukte von dC^N weiter zu untersuchen (Abb. 23 a)). Nachdem **5** in Wasser gelöst, bei RT 48 h inkubiert und lyophilisiert wurde, zeigte das HPLC-Spektrum bei 260 nm drei verschiedene *peaks* bei $t_R = 13.6$ min (*peak C*), 16.3 min (*peak A*) und 18.9 min (*peak B*). Durch ein ESI-Massenspektrometer, das an die HPLC gekoppelt war, konnte 5-Aza-2'-desoxycytidin eindeutig *peak A* und die *peaks B* und *C* den beiden Zersetzungsprodukten von dC^N , *N*-(formylamidino)-*N'*- β -D-2'-desoxyribofuranosylharnstoff (**22**) und 1- β -D-2'-desoxyribo-furanosyl-3-guanylharnstoff (**23**), zugeordnet werden (Abb. 23 a)). Bei pH 5.7 und 8.0 erhielt man analoge Ergebnisse.

Dasselbe Experiment wurde für das carbozyklische 5-Aza-2'-desoxycytidin durchgeführt. Wie in Abbildung 5.23 b) zu sehen ist, erhält man im HPLC-Spektrum bei 260 nm einen einzigen *peak* (D) bei $t_R = 12.5$ min nach Inkubation von **15** in Wasser (pH 7) für 24 h. Im ESI-Massenspektrum entsprach die zu dem *peak* zugehörige Masse eindeutig der Masse von $carbdC^N$ **15**. Bei den anderen pH-Werten wurde dasselbe Ergebnis erzielt.

Die gewonnenen Daten belegen, dass das carbozyklische 5-Aza-2'-desoxycytidin (**15**) in dem getesteten Zeitrahmen im Gegensatz zu seinem „natürlichen“ Analogon, dem Methyltransferaseinhibitor dC^N (**5**), stabil gegenüber Hydrolyse ist. Im Folgenden sollte getestet werden, ob das potentielle Suizidsubstrat einen Einfluss auf den genomischen Methylierungsgrad von HCT116-Zellen hat.

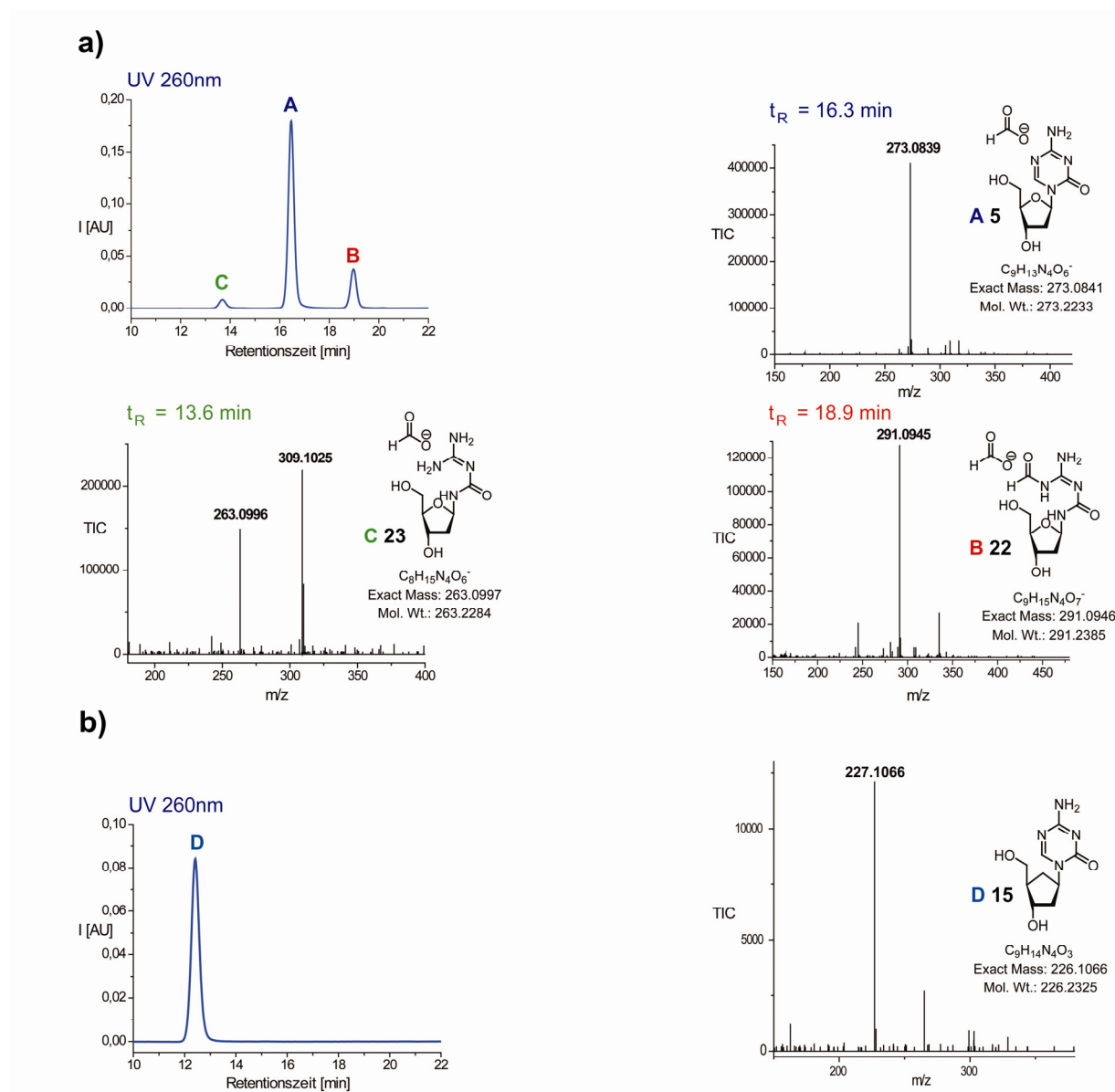


Abbildung 5.23 HPLC-ESI-MS-Chromatogramme: **a)** **5** (2 mM) und **b)** **15** (2 mM) wurden in Wasser (pH 7) und Phosphatpuffer (pH 5.7 und 8.0) gelöst und bei RT für 48 h inkubiert. Die Proben wurden lyophilisiert und analysiert. Die Ergebnisse sind für pH 7 gezeigt. Die Nukleoside **5**, **22** und **23** wurden in Form ihrer Formiataddukte detektiert, carbdC^N (**15**) als protoniertes Molekül.

5.2.4 Auswirkung von carbdC^N auf den globalen genomischen Methylierungsgrad von HCT116-Zellen

Der Wirkmechanismus des DNMT1-Inhibitors **5** beruht auf dessen Einbau in genomische DNA (vgl. Kapitel 3.5.1). Innerhalb von hemimethylierten CpG-Motiven kommt es im Zuge der Replikation zur Methylierung der Cytosine durch DNMT1.

Wird nun an Stelle von dC der Inhibitor dC^N eingebaut, bildet die Methyltransferase bei dem Versuch, das Nukleosid zu methylieren, eine dauerhafte, kovalente Bindung aus. Das Enzym bleibt irreversibel gehemmt, was zur Demethylierung der genomischen DNA führt. Die humane HCT116-Darmkrebszelllinie weist in unbehandeltem Zustand einen Gehalt von 4.5 % an methyliertem Cytosin auf, welcher durch Behandlung mit dC^N drastisch reduziert werden kann.^[198, 220]

Um zu untersuchen, ob auch carbdC^N einen Effekt auf das Methylierungsmuster genomischer DNA hat, wurden HCT116-Zellen über einen Zeitraum von jeweils sechs Tagen mit carbdC^N (**15**) sowie der Referenzverbindung dC^N (**5**) behandelt und im Anschluss daran der Methylierungsgrad bestimmt. Dazu wurden die Krebszellen mit Medium versetzt, welches die Nukleoside in verschiedenen Konzentrationen enthielt. Die Nukleoside wurden an den Tagen 2, 3, 5 und 6 zugegeben (siehe Kapitel 7.2). An Tag 7 wurden die Zellen geerntet, die genomische DNA extrahiert, verdaut und die so erhaltenen Nukleoside durch *reversed phase*-HPLC analysiert. Anhand der Integrale, die für die Nukleoside dC und dC^M erhalten wurden, konnte der globale Methylierungsgrad über Gleichung 5.1 (Kapitel 5.1.6.2) bestimmt werden. Als Negativkontrolle diente die DNA von Zellen, die nur mit Medium ohne sonstigen Zusatz behandelt wurden. Der stark zytotoxische Inhibitor **5** wurde als Positivkontrolle mit einer Konzentration von 1 µM eingesetzt und führte in Übereinstimmung mit der bestehenden Literatur zu einer Senkung des dC^M-Gehalts von 4.5 % auf 0.8 %.^[198, 220] Der Carbozyklus **15** wurde in höheren Konzentrationen von 20 µM, 300 µM und 1000 µM angewendet. Die Resultate sind in Tabelle 5.3 zusammengefasst.

Tabelle 5.3 Globaler genomischer Methylierungsgrad humaner HCT116-Zelllinien nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von dC^N **5** und carbdC^N **15**.

gDNA (HCT116)	Konzentration (µM)	% dC ^M
Kontrolle	-	4.5
dC ^N (5)	1	0.8
carbdC ^N (15)	20	3.5
carbdC ^N (15)	300	2.1
carbdC ^N (15)	1000	1.9

Die Behandlung der Krebszellen mit **15** führte zu einem konzentrationsabhängigen demethylierenden Effekt. Der absolute Methylierungsgrad konnte mit der höchsten Konzentration des carbozyklischen 5-Aza-2'-desoxycytidins von 1 mM auf 1.9 % herabgesetzt werden. Damit zeigte die genomische DNA nach der Behandlung mit carbdC^N (**15**) nur noch 42 % des dC^M-Gehalts der DNA der unbehandelten Zellen.

5.2.5 Auswirkung von carbdC^N auf die Zellproliferation von HCT116-Zellen

Parallel zu den Untersuchungen zur globalen genomischen DNA-Demethylierung wurde mittels eines WST-Assays die Wirkung des carbozyklischen Nukleosids auf die Zellproliferation ermittelt. Als Folge der Demethylierung der genomischen DNA, insbesondere von fehlerhaft hypermethylierten Genpromotoren, sollte die Behandlung mit den Nukleosidinhibitoren zur Reexpression der betroffenen Gene führen. Durch die hiermit verbundene Reexpression von Tumorsuppressorgenen sollten die Kontrollmechanismen der Zelle wieder greifen, die bei einem unkontrollierten Wachstum die Zellteilung stoppen und die Apoptose der Tumorzellen einleiten. Für HCT116-Zellen wurde bereits erfolgreich gezeigt, dass das Ausschalten bzw. die Inhibierung von DNMT1 durch **5** ein verringertes Wachstum zur Folge hat.^[111, 220, 223]

Für den Proliferationsassay wurden in 96-*well* Platten je 2500 HCT116-Zellen pro *well* in 100 µL Medium eingesät und an den Tagen 2, 3 und 4 nach der Einsaat mit verschiedenen Konzentrationen der Nukleoside **5** (Positivkontrolle) bzw. **15** inkubiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nur mit Medium ohne sonstigen Zusatz inkubiert wurden. An Tag 5 wurde mit Hilfe des WST-1-Zellproliferationsreagenz (*Roche Applied Science*) die Zellviabilität ermittelt. Dieser Assay beruht auf der Umsetzung des Tetrazoliumsalzes WST-1 durch mitochondriale Dehydrogenasen zu wasserlöslichem Formazan, wobei die Menge an gebildetem Produkt direkt mit der Anzahl an gesunden, metabolisch aktiven Zellen korreliert. Durch die Quantifizierung des Formazans mit einem *multiwell*-Spektrophotometer (*ELISA Reader*) können somit Aussagen über das Zellwachstum gemacht werden.^[379]

Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.24 prozentual in Relation zur Negativkontrolle angegeben.

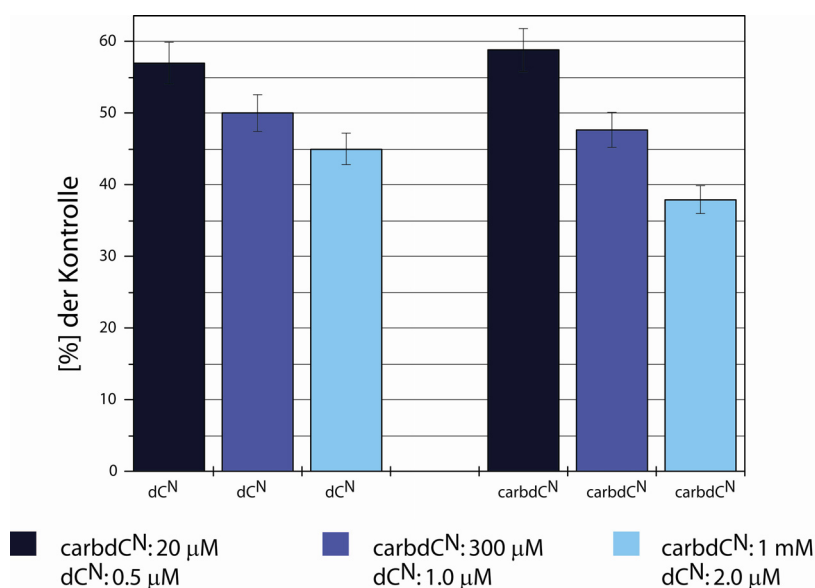


Abbildung 5.24 Auswirkung des carbozyklischen 5-Aza-2'-desoxycytidins **15** auf die Proliferation von HCT116-Darmkrebszellen. Als Referenz wurde dC^N (**5**) verwendet.

Während bereits eine Konzentration von 2 µM des DNMT1-Inhibitors dC^N ausreichte, um das Zellwachstum auf 45 % zu reduzieren, benötigte man eine Konzentration von 300 µM des carbozyklischen Nukleosids **15**, um ungefähr das selbe Ergebnis zu erzielen. Mit einer Konzentration von 1 mM carbdC^N gelang es, das Wachstum auf 38 % zu senken.

Bei der Diskussion der Ergebnisse muss beachtet werden, dass auf dem bisherigen Stand der Untersuchungen keine Aussagen über die Ursachen der hemmenden Wirkung von **15** auf die Zellproliferation gemacht werden können. Während bei der Ermittlung des genomischen dC^M-Gehalts eine recht spezifische Wechselwirkung betrachtet wird – nämlich die zwischen dem Nukleosid und der zellulären Methylierungsmaschinerie – sieht man bei einem Zellproliferationsassay die Wirkung der Substanzen auf eine große Vielzahl an Signalwegen. Auf welche Art ein Stoff das Zellwachstum letztendlich hemmt, kann in der Regel nur durch aufwändige Studien geklärt werden.

5.2.6 Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick

Aufgrund der Tatsache, dass der bekannteste Inhibitor der humanen Methyltransferase DNMT1 5-Aza-2'-desoxycytidin (**5**) einige gravierende Nachteile besitzt, erschien es lohnenswert, nach alternativen Nukleosiden zu suchen, die bei

gleicher demethylierender Wirkung eine erhöhte hydrolytische Stabilität und eine verminderte Zytotoxizität aufweisen.

Da carbozyklische Nukleoside in wässrigen Lösungen im Allgemeinen stabiler als natürliche Nukleoside sind, wurde das carbozyklische Analogon carbdC^N (**15**) von A. Gégout synthetisiert. Nach erfolgreicher Synthese und Charakterisierung konnte durch NMR-Experimente und HPLC-ESI-Massenspektrometrie nachgewiesen werden, dass sich **15** auch nach 48 h Inkubation in saurer, neutraler und basischer wässriger Lösung nicht zersetzt hat. Im Vergleich dazu ist der Inhibitor **5** nach derselben Zeit bereits in beträchtlichem Maße hydrolysiert worden. In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass der globale genomische Methylierungsgrad von HCT116-Darmkrebszellen nach mehrmaliger Inkubation mit **15** (1mM) von 4.5 % auf 1.9 % gesenkt werden konnte.

Die geringere demethylierende Wirkung von carbdC^N (**15**) im Vergleich zu dC^N (**5**) ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Biotransformation des carbozyklischen Nukleosids in das entsprechende Triphosphat weniger effektiv ist und **15** somit schlechter in die genomische DNA eingebaut wird. Da Nukleoside erst als 5'-Nukleosidtriphosphate ihre biologische Wirkung bei der enzymatischen DNA-Synthese entfalten, ist eine effiziente enzymatische Bildung dieser Metabolite eine essenzielle Voraussetzung. Dieser Aktivierungsprozess wird sehr oft durch zelluläre Kinasen durchgeführt, die mit carbdC^N (**15**) möglicherweise nur ineffizient arbeiten. Besonders die erste Phosphorylierung in das Nukleosid-Monophosphat ist häufig der limitierende Schritt. In diesem Zusammenhang könnte die Synthese eines entsprechenden lipophilen Pronukleotids von carbdC^N (**15**) dessen Wirkung erhöhen. Hierzu wurden von Meier sogenannte *cycloSal*-Pronukleotide entwickelt, welche in Zellen aufgenommen werden, dort selektiv das Monophosphat liefern und dann durch entsprechende Kinasen in das Triphosphat überführt und in die genomische DNA eingebaut werden.^[380, 381]

In der vorliegenden Studie konnte nachgewiesen werden, dass das carbozyklische 5-Aza-2'-desoxycytidin (**15**) den globalen genomischen Methylierungsgrad senken kann, nicht aber, dass das Nukleosid auch tatsächlich die humane Methyltransferase DNMT1 über einen kovalenten Komplex bindet und somit als Suizidsubstrat für das Enzym wirkt. In weiterführenden Experimenten sollte versucht werden, carbdC^N entweder enzymatisch über sein Triphosphat oder chemisch durch Phosphoramiditchemie in kurze doppelsträngige DNA innerhalb von

hemimethylierten CpG-Motiven einzubauen und anhand von EMS-Assays (vgl. Kapitel 5.1.5) Bindungsstudien mit der humanen Methyltransferase DNMT1 anzufertigen. Somit sollte geprüft werden, ob **15** überhaupt ein Inhibitor für dieses Enzym ist, wie stabil gegebenenfalls die gebildete Bindung zwischen DNA und Enzym ist und wie gut DNMT1 mit diesen Substraten im Vergleich zu dC^N-haltiger DNA wechselwirkt – denn der geringere demethylierende Effekt könnte auch in einer verringerten Bindungsaffinität der Methyltransferase zu dem in genomische DNA inkorporierten carbozyklischen Nukleosid begründet liegen.

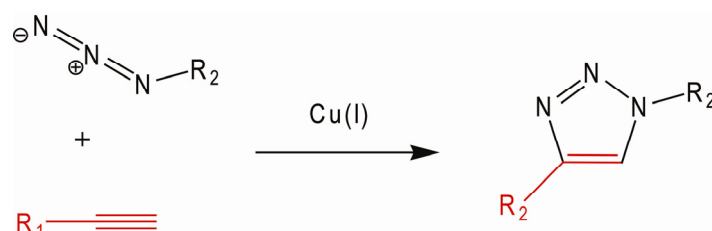
Daneben müssen die Studien auch auf andere Zelllinien erweitert werden, da die Auswirkungen einer Inhibierung von DNMT1 vom Zelltyp abhängig sein können.^[382] Alles in allem besitzt der hier vorgestellte potenzielle Inhibitor der humanen Methyltransferase DNMT1 gute Voraussetzungen für einen späteren Einsatz *in vivo* und kann möglicherweise auch in klinischen Studien zur Anwendung kommen.

6 Selektive Modifikation von DNA durch die Cu(I)-katalysierte Alkin-Azid-Zykloaddition

6.1 Einleitung und Aufgabenstellung

Die 1,3-dipolare Zykloaddition zwischen Aziden und Alkinen (Huisgen-Reaktion)^[383, 384] hat seit der Entdeckung, dass diese effizient durch Cu(I) katalysiert werden kann, eine Welle neuer Anwendungen ausgelöst (> 1000 Publikationen).^[385]

Diese kupferkatalysierte Variante (Huisgen-Meldal-Sharpless-Reaktion) ist momentan das prominenteste Beispiel aus der Gruppe der Click-Reaktionen (Schema 6.1).^[386-388]



Schema 6.1 Die Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin-Zykloaddition (CuAAC).

Nach der Definition von *Sharpless* zeichnen sich Click-Reaktionen durch hohe Ausbeuten, milde Reaktionsbedingungen und die Tatsache aus, dass sie eine große Anzahl funktioneller Gruppen tolerieren. Typischerweise benötigen diese Reaktionen nur eine einfache oder überhaupt keine Aufarbeitung und Aufreinigung der Produkte. Die wichtigste Eigenschaft der kupferkatalysierten Alkin-Azid-Zykloaddition (im Folgenden nur noch als Click-Reaktion oder CuAAC bezeichnet) ist ihre Bioorthogonalität, da im Allgemeinen weder Azide noch terminale Alkine in natürlichen Systemen vorkommen. Des Weiteren sind sowohl Alkine als auch Azide in wässrigen Lösungen über einen längeren Zeitraum stabil. Bis jetzt konnte eine ganze Reihe an Biomolekülen mit dieser Methode funktionalisiert werden, darunter Peptide,^[389-391] Proteine,^[392-399] Polysaccharide^[400] und sogar ein ganzer Virus.^[401, 402] Da Kupferionen DNA-Strangbrüche induzieren,^[403, 404] wurde die effektive Funktionalisierung von DNA durch Click-Chemie erst durch Zusatz eines Cu(I)-stabilisierenden Liganden (TBTA) möglich.^[405]

Die Modifikation von DNA mit verschiedenen Funktionen, wie Fluoreszenzfarbstoffen, Fluoreszenz-*Quenchern*, Affinitätsmarkern (z.B. Biotin oder Digoxigenin), lipophilen Molekülen wie Cholesterin u.v.m. findet nicht nur in der Forschung, sondern auch in der molekularen Diagnostik breite Anwendung. Da viele dieser Label zu instabil sind für die extremen Bedingungen der DNA-Festphasensynthese oder nicht kompatibel mit der P(III)-Chemie während der chemischen DNA-Synthese sind, können sie nicht präsynthetisch an die DNA angebracht werden, sondern müssen auf postsynthetischem Weg in die DNA eingeführt werden. Die gängigste Methode besteht darin, modifizierte Nukleoside mit einer Aminoalkyl-funktionalisierten Seitenkette einzubauen und diese anschließend mit dem Aktivester des jeweiligen Markers umzusetzen.^[406] Die großen Nachteile hierbei sind die niedrigen Kupplungsausbeuten und die Instabilität der Aktivester gegen Hydrolyse. Diese Probleme werden durch die CuAAC gelöst. Daher könnte sich diese Methode sogar auf dem Oligonukleotidmarkt etablieren. Bis jetzt ist eine ganze Reihe neuer Anwendungen durch den „Click an DNA“ möglich geworden, worauf an dieser Stelle allerdings nicht weiter eingegangen werden soll, sondern auf gute Übersichtsartikel verwiesen wird.^[388, 407-414]

In unserer Arbeitsgruppe gelang es *P. Gramlich*, die Funktionalisierung von DNA durch den Einsatz des ungeschützten, Alkin-modifizierten Nukleosids **24** sowie der TMS- und TIPS-geschützten, Alkin-modifizierten Nukleoside **25** und **26** dahingehend zu erweitern, dass Oligonukleotide über Click-Chemie mit bis zu drei verschiedenen Markergruppen ausgestattet werden konnten (Abb. 6.1).^[415] Solche hochmodifizierten Oligonukleotide finden beispielsweise Anwendung als spezielle FRET-Proben oder in der Nanotechnologie.

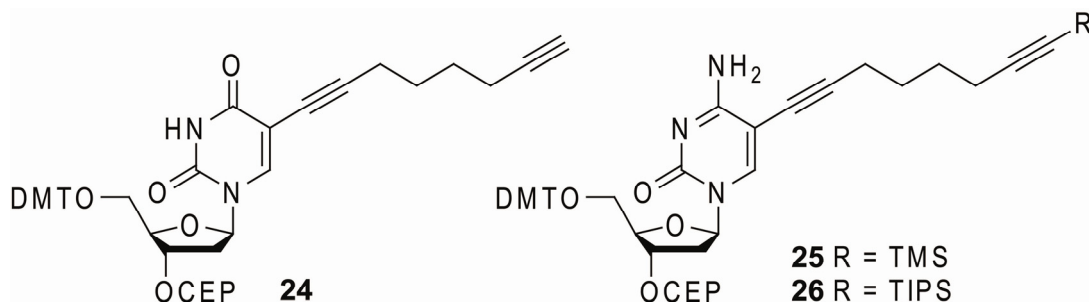
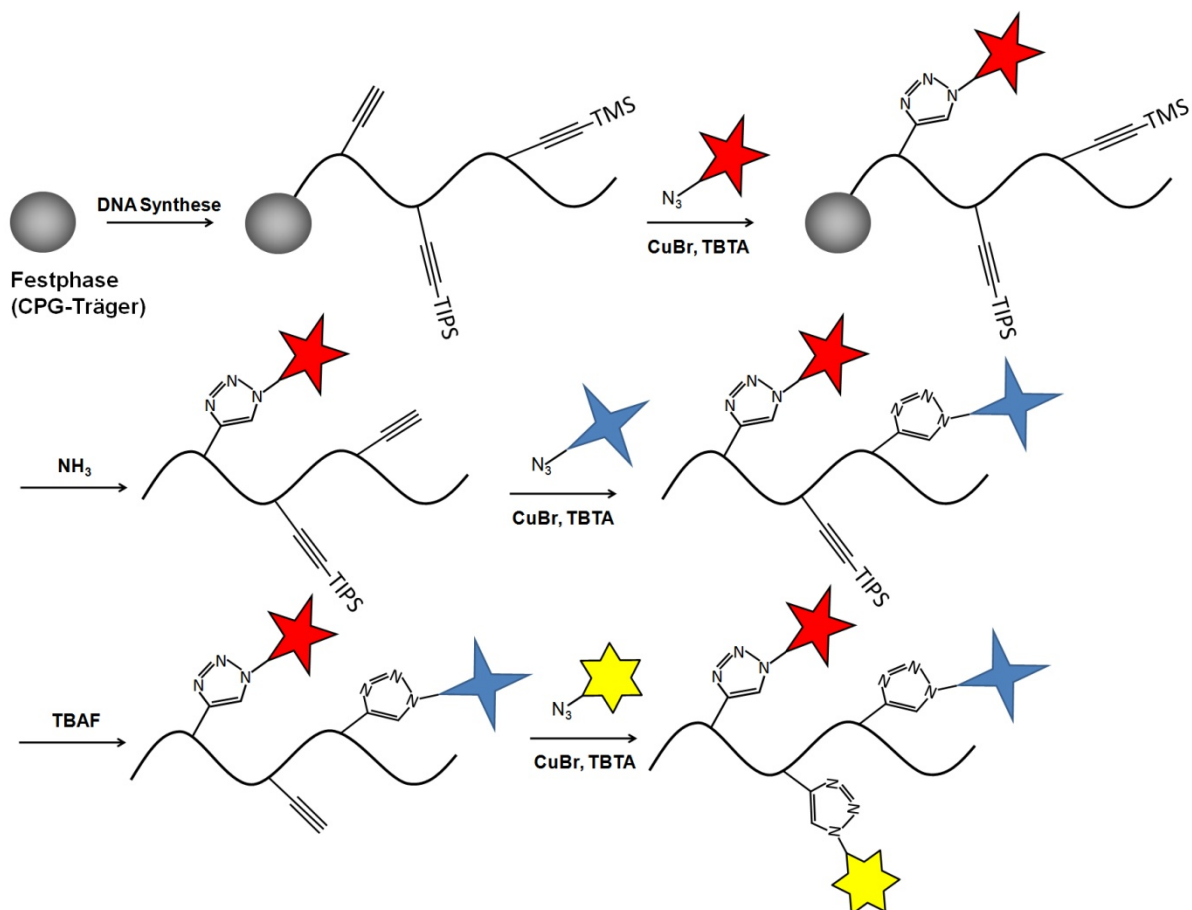


Abbildung 6.1 Alkin-modifizierte Nukleoside **24–26** zur Click-Funktionalisierung von Oligonukleotiden mit drei unterschiedlichen Markern. Die Synthese des Phosphoramidits **24** zur DNA-Festphasensynthese ist in Kapitel 7.1 aufgeführt. DMT = 4,4'-Dimethoxytrityl; CEP = β -Cyanoethyl-Phosphoramidit

Zuerst wurden die beiden geschützten, alkinylierten Cytidinanaloge **25** und **26** zusätzlich zu dem freien Alkin-dU-Baustein **24** in DNA-Stränge eingebaut. Die erste Click-Reaktion erfolgte noch an der Festphase, wobei hier nur Marker verwendet werden konnten, die die stark basischen Bedingungen während der Abspaltung der DNA vom Trägermaterial unverändert überstanden. Nach Abspaltung der DNA vom Träger und damit einhergehender Entfernung der TMS-Schutzgruppe wurde mittels HPLC aufgereinigt. Der zweite „Click“ erfolgte dann in Lösung. Anschließend wurde die doppelt markierte DNA mit Ethanol gefällt und die TIPS-Alkingruppe mit TBAF entschützt. Nach der dritten Click-Reaktion und einer finalen Fällung wurde bei dreifach modifizierten Oligonukleotiden eine Ausbeute von rund 50 % erzielt (siehe Schema 6.2). Bei Oligonukleotiden mit nur zwei verschiedenen Markern, wurden die Alkin-Nukleoside **24** und **26** eingebaut und beide Click-Reaktionen konnten in Lösung durchgeführt werden (d.h. die DNA wurde bereits vorher vom Trägermaterial abgespaltet und gereinigt). Die Ausbeuten bewegten sich dabei, je nach dem welche Azide verwendet wurden, zwischen 60 und 90 %.^[415]



Schema 6.2 Funktionalisierung von Oligonukleotiden mit drei verschiedenen Markeraziden (rot, blau und gelb) durch Click-Chemie (Click-Click-Click).^[415]

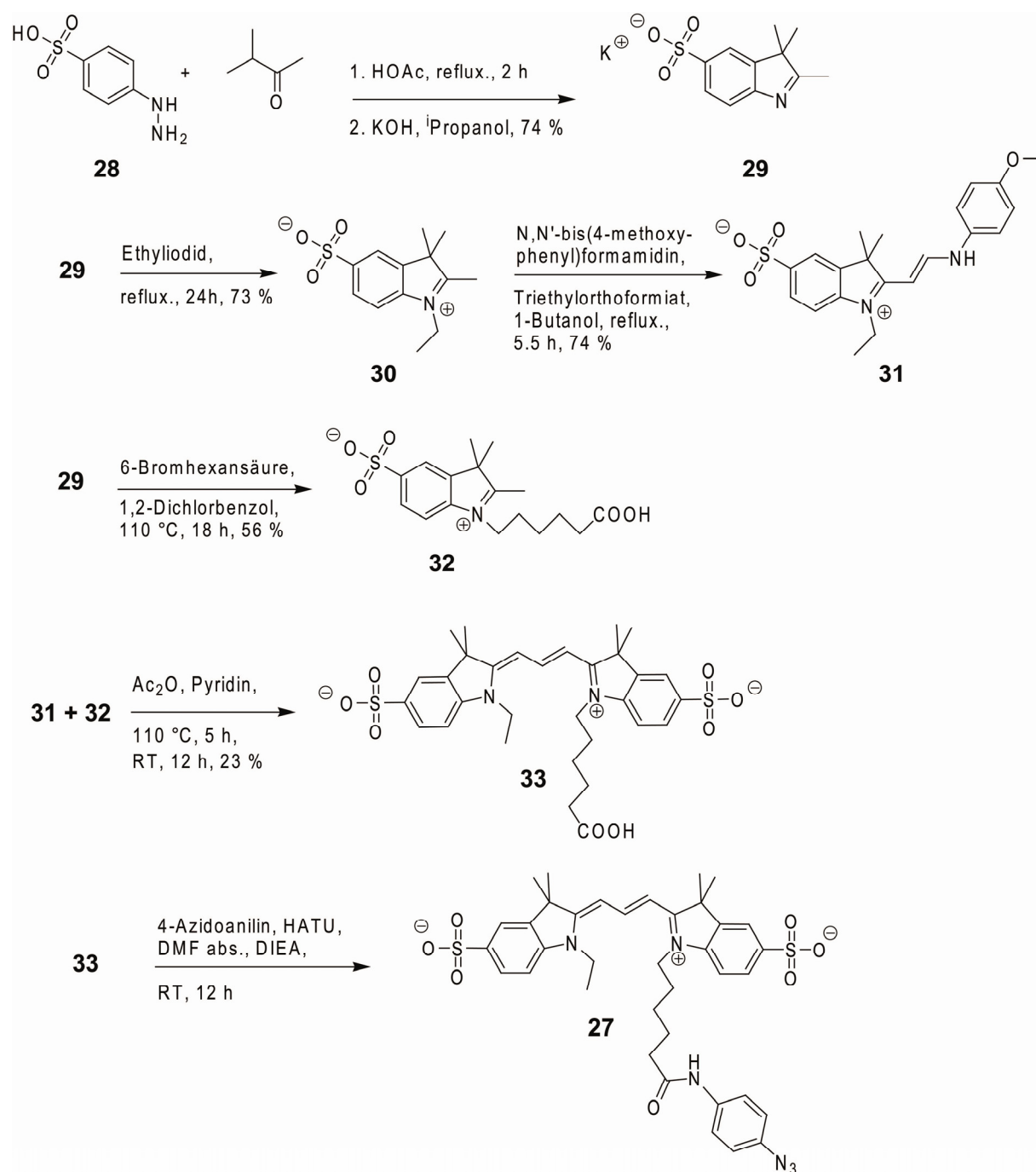
Im Rahmen dieser Studie zum Doppel- und Dreifachclick an DNA wurden u.a. Biotinazid, Dabcylazid, Azide der Farbstoffe Fluorescein und TAMRA sowie Pyrenazid eingesetzt. Um das Repertoire mit einem weiteren, häufig genutzten Fluoreszenzfarbstoff zu erweitern, sollte im Folgenden wasserlösliches Cy3-Azid synthetisiert und über Click-Chemie an DNA gebunden werden. Außerdem war die Synthese des Azids von Oktaarginin (Arg_8-N_3) geplant. Wenn es gelingen würde, diesen Peptidvektor an DNA-Stränge zu konjugieren, könnte dies möglicherweise dazu genutzt werden, die so modifizierten DNA-Doppelstränge **DS4–6** aus Kapitel 5.1 bis in den Zellkern zu transfizieren.

Das abschließende Projekt wurde in Kooperation mit A. Schlossbauer (Arbeitskreis Bein)^[416] durchgeführt. Hierbei sollten mesoporöse Silikananopartikel durch Click-Chemie mit DNA-Doppelsträngen so funktionalisiert werden, dass ein temperaturabhängiges Kappensystem zur kontrollierten Freisetzung von eingelagerten Molekülen aufgebaut werden konnte.

6.2 Synthese und Clickreaktion von Cy3-N₃ und Arg₈-N₃

6.2.1 Cy3-N₃ (27)

Die Darstellung des Cyaninfarbstoffs **33** erfolgte nach der Synthesevorschrift von *Waggoner et al.* (Schema 6.3).^[417]



Schema 6.3 Synthese des Cyaninflouoreszenzfarbstoffazids (Cy3-Azid, **27**).

Ausgehend von *p*-Hydrazinobenzolsulfonsäure und 3-Methyl-2-butanon konnte das Indol **29** durch eine konventionelle Fischer-Indol-Synthese im Gramm-Maßstab hergestellt werden. Durch Reaktion von **29** mit Ethyliodid bzw. 6-Bromhexansäure wurden die beiden Indoleniniumsalze **30** und **32** generiert. Im Unterschied zur Originalpublikation wurde *N,N'*-Bis(4-methoxyphenyl)formamidin anstatt *N,N'*-Diphenylformamidin verwendet, wodurch die Ausbeute des Intermediats **31** mehr als verdoppelt werden konnte. Nach Kupplung der beiden Indolderivate **31** und **32** und Aufreinigung durch RP-HPLC konnte die freie Säure des Cyaninfarbstoffs mit HATU aktiviert und mit 4-Azidoanilin zum gewünschten Cy3-Azid **27** umgesetzt werden. Dieses wurde ebenfalls über RP-HPLC gereinigt und stand nun in Form seines Bis-Triethylammoniumsalzes für die folgenden Versuche zur Fluoreszenzmarkierung von DNA über CuAAC zur Verfügung.

In Abbildung 6.2 sind die MALDI-Spektren der Sequenz eines Doppelclicks von Dabcy lazid **35** (Abb. 6.2 d)) und Cy3-Azid an das Oligonukleotid **SC1** (Sequenz: 5'- GCGCXGTTTCATTYGCG -3'; X = **26**, Y = **24**), sowie das HPLC Spektrum der DNA nach der gesamten Reaktionssequenz gezeigt.^[415] Die Konjugation mit Dabcy lazid sowie die Entschützung der TIPS-Gruppe verliefen quantitativ. Die MALDI-Spektren wurden nach Fällung und Entsalzen der DNA ohne weitere Aufarbeitung aufgenommen. Man erkennt, dass nach dem Click mit dem Cy3-Azid zwei Reaktionsprodukte entstanden sind (Abb. 6.2 b)). Der Massenunterschied der beiden Signale von 514.8 g/mol entspricht dem Verlust des chromophoren Systems **34**. Dieses Resultat wird durch das HPL-Chromatogramm des Oligonukleotids nach zweifacher Clickreaktion untermauert (Abb. 6.2 c)). Hier sind zwei Signale bei einer Absorption von 260 nm (Absorption der DNA) zu sehen, doch nur das Signal bei einer Retentionszeit von 33 min absorbiert zusätzlich auch bei 552 nm (Absorption von Cy3). Nach Separation der beiden Peaks und erneuter MALDI-TOF Analyse konnten die erhaltenen Signale eindeutig den beiden gefundenen Massen zugeordnet werden.

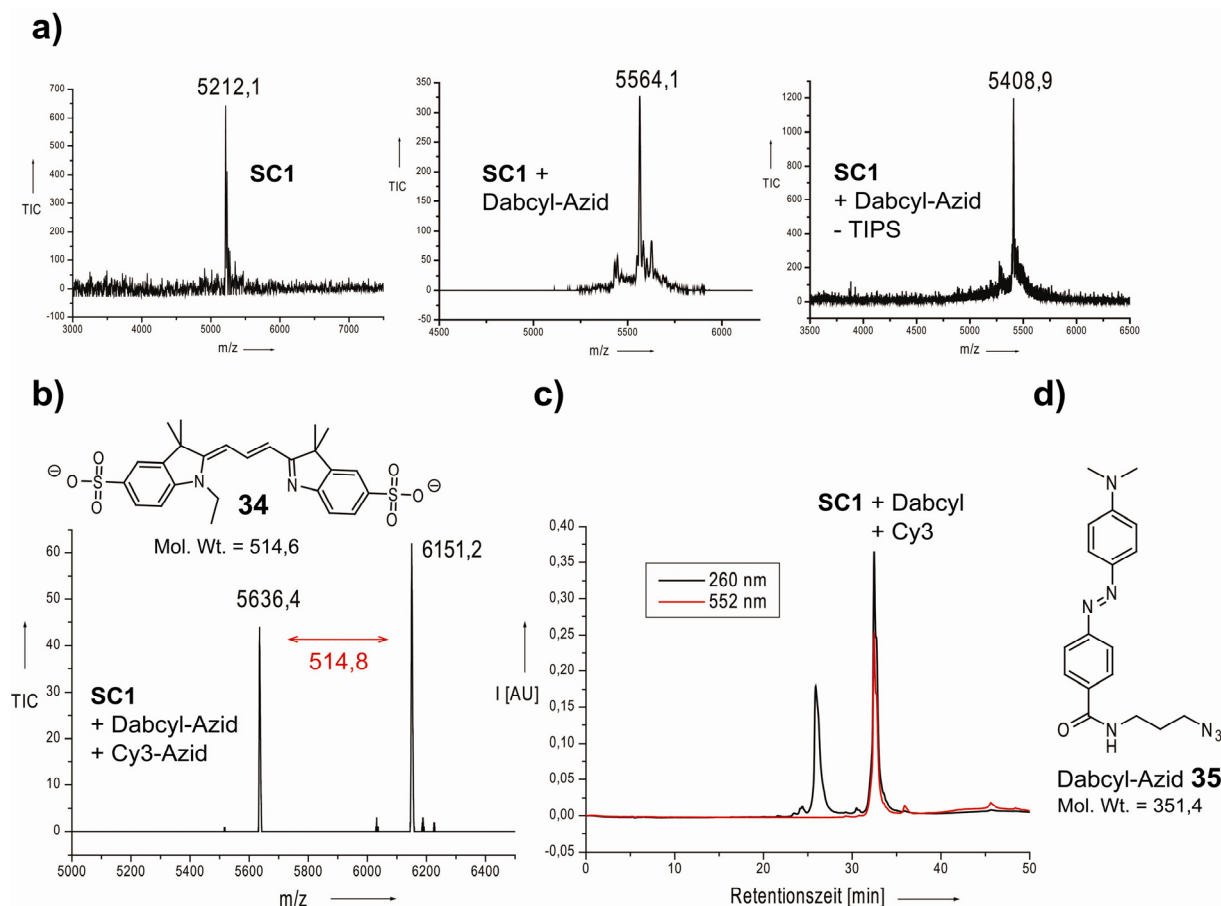
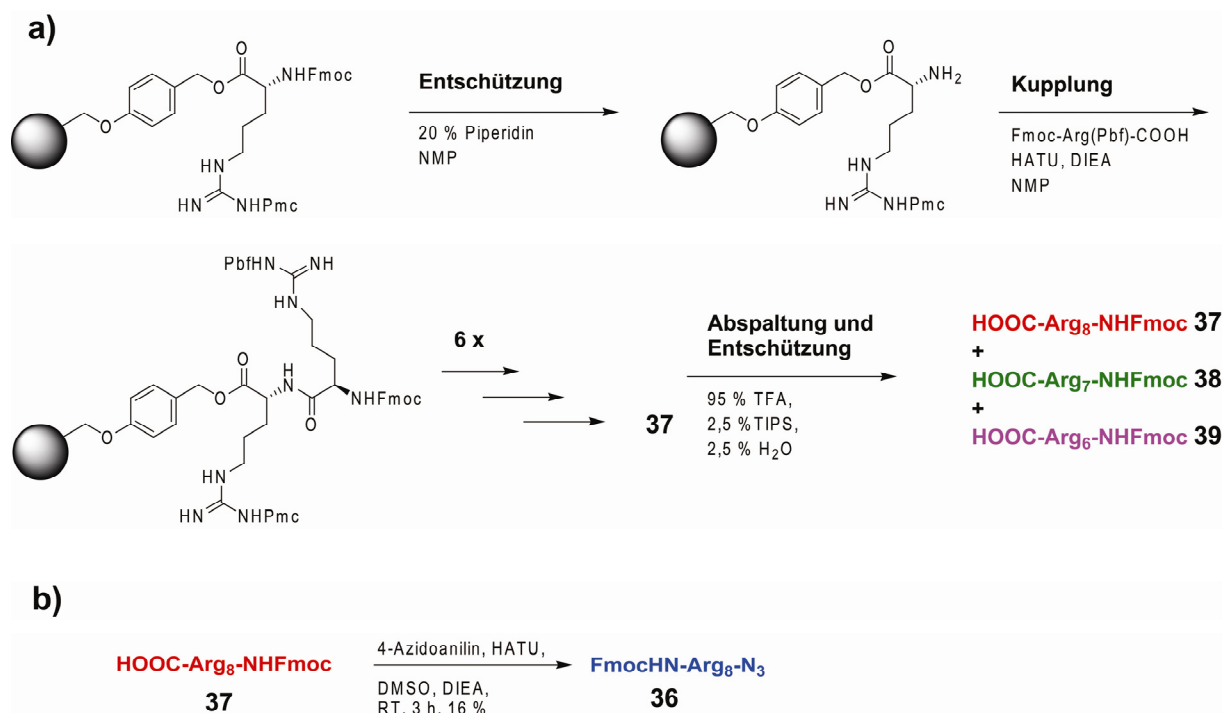


Abbildung 6.2 Doppelclicksequenz von Dabcy lazid **35** ($M_{\text{ber.}} = 351.4 \text{ g/mol}$) und Cy3-Azid ($M_{\text{ber.}} = 745.3 \text{ g/mol}$) an SC1 (Sequenz: 5'-GCGCXGTTTCATTYGC-3'; X = **26**, Y = **24**). a) MALDI-Spektren des Oligonukleotids SC1 ($M_{\text{ber.}} = 5212.1 \text{ g/mol}$, $M_{\text{gef.}} = 5212.1$) nach Click mit **35** ($M_{\text{ber.}}(\text{SC1} + \text{35}) = 5563.5 \text{ g/mol}$; $M_{\text{gef.}} = 5564.1$) und anschließender Entfernung der TIPS-Schutzgruppe mit TBAF ($M_{\text{ber.}}(\text{SC1} + \text{35} - \text{TIPS}) = 5407.1 \text{ g/mol}$; $M_{\text{gef.}} = 5408.9$). b) MALDI-Spektrum nach Clickreaktion mit Cy3-Azid. $M_{\text{ber.}}(\text{SC1} + \text{35} - \text{TIPS} + \text{Cy3}) = 6152.4 \text{ g/mol}$; $M_{\text{gef.}} = 6151.2$ und 5636.4). Die Massendifferenz von 514.8 g/mol entspricht der Masse des Chromophors **34**. c) HPL-Chromatogramm des Produkts aufgenommen bei 260 nm (schwarz) und 552 nm (rot). d) Dabcy lazid **35**.

Neben den Reaktionsbedingungen, die im experimentellen Teil beschrieben sind, wurden verschiedene Variationen der Reaktionszeit und Temperatur sowie der Menge an zugesetztem Cu-Katalysator getestet, um dem Verlust der chromophoren Gruppe des Cyaninfarbstoffs vorzubeugen und so die Ausbeute des zweifach modifizierten Oligonukleotids zu erhöhen. Eine auf 30 min verkürzte Reaktionszeit konnte zwar im Verhältnis die Menge des Zersetzungsprodukts reduzieren, allerdings war nun auch noch zu einem Großteil unmodifiziertes Edukt enthalten. Die Verwendung einer verringerten Menge an CuBr sowie eine Temperaturerhöhung in Verbindung mit kürzeren Reaktionszeiten ergaben ebenfalls keine Verbesserung.

6.2.2 Arg₈-N₃ (36)

Die Synthese des Oktaarginins erfolgte durch Fmoc-Peptidfestphasensynthese an einem mit D-Arginin vorbeladenen Wang-Harz (*Fa. Bachem*). Der eingesetzte Argininbaustein besaß ebenfalls D-Konfiguration, da Peptide mit dieser unnatürlichen Konfiguration eine erhöhte Stabilität gegenüber enzymatischem Abbau zeigen.^[418, 419]

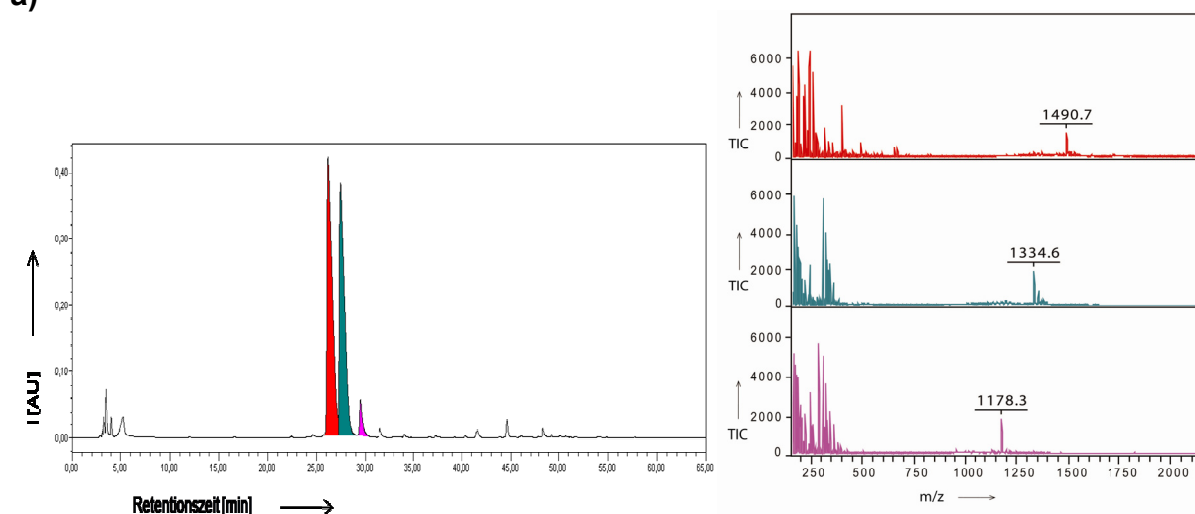


Schema 6.4 a) Peptidfestphasensynthese von Oktaarginin **37** (rot) sowie der Nebenprodukte Hepta- **38** (grün) und Hexaarginin **39** (violett). b) Funktionalisierung von **37** mit dem Aktivator HATU und *p*-Azidoanilin zum Oktaarginin-Azid **36** (blau).

Der Syntheseyklus ist in Schema 6.4 a) dargestellt und umfasst die Schritte Entschützung, Kupplung sowie eine finale Abspaltung vom Trägermaterial (vgl. experimenteller Teil). Zwischen jedem Schritt wurde der Träger intensiv gewaschen. Da die einzelnen Kupplungen nicht quantitativ verliefen, bestand das Produkt aus einem Peptidgemisch. Durch anschließende RP-HPL-Chromatographie konnten Oktaarginin **37**, Heptaarginin **38** und Hexaarginin **39** voneinander getrennt und über MALDI-TOF-Massenspektrometrie nachgewiesen werden (Abb. 6.3 a)). Die letzte Fmoc-Schutzgruppe des Oligopeptids wurde nicht entfernt, um zum Einen eine saubere Aufreinigung zu gewährleisten und zum Anderen bei der folgenden Reaktion

mit *p*-Azidoanilin zu Arg₈-N₃ **36** eine Kupplung der Peptide untereinander zu verhindern (Schema 6.4 b)).

a)



b)

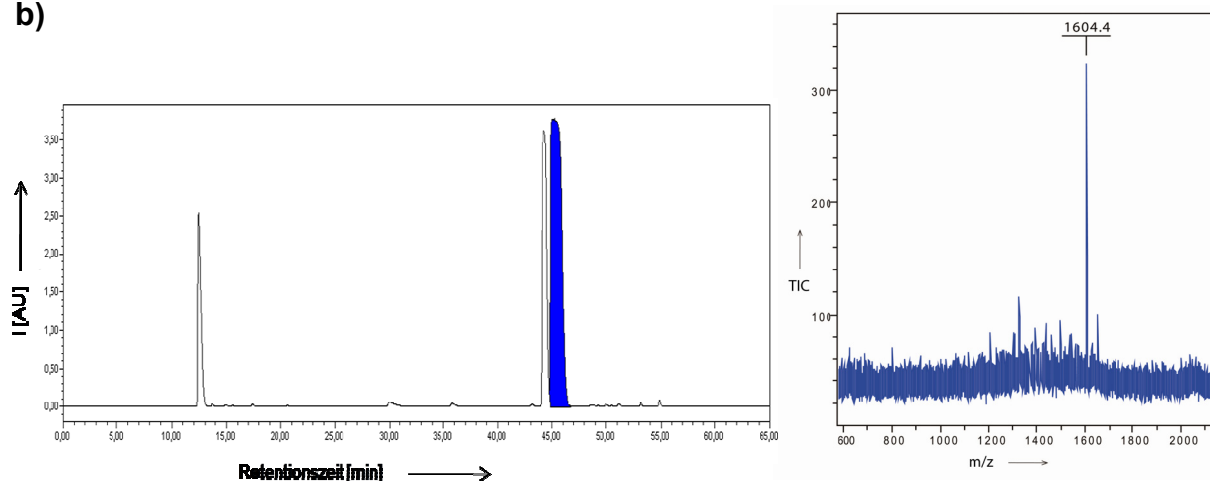


Abbildung 6.3 a) HPL-Chromatogramm und MALDI-Spektrum der Peptide Oktaarginin **37** (rot), Heptaarginin **38** (grün) und Hexaarginin **39** (violett). $M_{\text{ber.}}(\mathbf{37}) = 1489.7 \text{ g/mol}$, $M_{\text{gef.}}(\mathbf{37}) = 1490.7 \text{ g/mol}$; $M_{\text{ber.}}(\mathbf{38}) = 1333.5 \text{ g/mol}$, $M_{\text{gef.}}(\mathbf{38}) = 1334.6 \text{ g/mol}$; $M_{\text{ber.}}(\mathbf{39}) = 1177.4 \text{ g/mol}$, $M_{\text{gef.}}(\mathbf{39}) = 1178.3 \text{ g/mol}$; b) HPL-Rohchromatogramm und MALDI-Spektrum des Oktaarginin-Azids **36** (blau). $M_{\text{ber.}}(\mathbf{36}) = 1605.9 \text{ g/mol}$, $M_{\text{gef.}}(\mathbf{36}) = 1604.4 \text{ g/mol}$.

Mit Hilfe der Cu(I)-katalysierten Azid-Alkin Zykloaddition sollte nun das aufgereinigte Oktaarginin-Azid an einen Alkin-modifizierten DNA-Strang gebunden werden. Die ersten Versuche dazu schlugen allerdings fehl. Auf Grund der geringen Mengen an synthetisiertem Peptid war es im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich, verschiedene Bedingungen für die Click-Reaktion zu testen.

6.2.3 Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick

Das Konzept der Click-Chemie, insbesondere der Cu(I)-katalysierten Azid-Alkin-Zykloaddition, übt einen großen Einfluss speziell auf zwei Themengebiete aus: Die Markierung von Biomolekülen (Biokonjugation) und die Materialwissenschaften.^[388, 408, 412, 420, 421] Durch die unkomplizierte Reaktionsführung (Toleranz von Wasser, Raumtemperatur), gut zugängliche Edukte, die hohe Reaktionsspezifität und hohe Toleranz ungeschützter chemischer Funktionalitäten, sowie die hohen Ausbeuten, gelingt es, hochkomplexe Moleküle und Materialien selektiv und effizient zu funktionalisieren. Mit Hilfe der CuAAC wird somit der Zugang zu neuen Strukturen ermöglicht. Darüber hinaus wird diese Reaktion in Zukunft nicht nur eine Alternative zu etablierten Methoden darstellen, sondern diese möglicherweise sogar ersetzen. Im Rahmen der Mehrfachmodifikation von Oligonukleotiden wurde in diesem Kapitel die Synthese des Fluoreszenzfarbstoffazids Cy3-N₃ **27** und des Oktaarginin-Azids **36** beschrieben.

Im Fall von **27** gelang es, den Farbstoff über CuAAC an Alkin-modifizierte DNA-Stränge zu konjugieren, wobei es zu einem gewissen Grad zum Verlust des chromophoren Systems **34** kam, so dass keine quantitativen Ausbeuten erhalten wurden. Variationen der Reaktionszeiten und -temperaturen sowie geringere Mengen des zugesetzten Cu(I)-Katalysators führten zu keiner höheren Ausbeute des intakten Cy3-DNA Konstrukts. Möglicherweise ist der Cu-Katalysator an der Abspaltung des Chromophors beteiligt. In weiterführenden Experimenten sollte daher getestet werden, ob eine Stabilisierung des Systems erreicht werden kann, wenn der Azidlinker an anderer Stelle (nicht über den Stickstoff des Indols) mit dem Cyaninfarbstoff verknüpft wird.

Nach Reinigung und Analyse des Oktaarginin-Azids **36** sollte dieses Peptid ebenfalls über Click-Chemie an DNA gebunden werden. Allerdings konnte das Peptid-DNA-Konjugat nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der sehr geringen Mengen des hergestellten Azids konnten nur wenige Click-Reaktionen durchgeführt werden. Mittlerweile ist die Synthese von DNA-Peptid-Konjugaten durch CuAAC beschrieben worden und auch Azid-modifizierte Aminosäuren sind seit einiger Zeit kommerziell erhältlich, was die Herstellung Azid-modifizierter Peptide durch manuelle Festphasensynthese stark vereinfacht.^[422]

Die CuAAC bietet auf Grund ihrer genannten Eigenschaften die Möglichkeit, auch komplizierte DNA-Konstrukte, wie beispielsweise die in Kapitel 5.1 beschriebenen *Dumbbells*, wesentlich effektiver und vor allem in größerer Menge zu synthetisieren.^[423] So könnte in Zukunft auch eine Anwendung solcher Substrate für therapeutische Zwecke in Betracht gezogen werden, da die Herstellungskosten durch Anwendung der CuAAC signifikant reduziert werden könnten.

6.3 Synthese eines programmierbaren, DNA-basierten Kappensystems für nanoporöse Silikapartikel

6.3.1 Einleitung und Aufgabenstellung

Mesoporöses Silikamaterial wird bereits seit längerer Zeit in der Affinitätschromatographie^[424] oder als Träger von Katalysatoren^[425] sowie Biomolekülen^[426] eingesetzt. Dieses Material zeichnet sich besonders durch seine große Oberfläche (700–1500 m²/g) sowie die kontrollierbare Porengröße und Morphologie der Partikel aus. Außerdem konnte gezeigt werden, dass manche Säugetierzellen kolloidale mesoporöse Silikapartikel (CMS) aktiv durch Endozytose aufnehmen, die Partikel anschließend aus den Endosomen freigesetzt werden und so in das Cytosol gelangen konnten. Dabei hatten die Silikapartikel keinen cytotoxischen Effekt auf die Zellen.^[427-429]

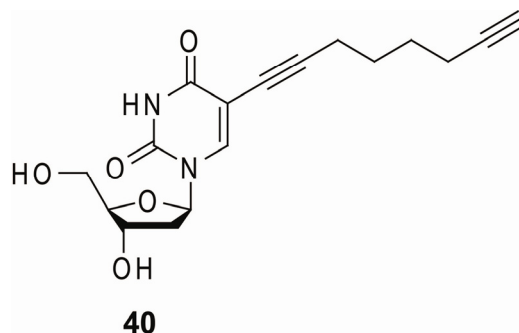
Vor kurzem wurden Systeme publiziert, die es ermöglichen, Gastmoleküle kontrolliert aus mesoporösen Silikamaterialien freizusetzen.^[430-432] Die Mechanismen basieren z.B. auf Änderungen des pH-Wertes oder des Reduktionspotentials bei deren Eintritt in Zellen. In der Arbeitsgruppe *Bein* konnte gezeigt werden, dass die Poren von mesoporösen Silikananopartikeln durch ein Biotin-Avidin-Kappensystem derart verschlossen werden können, dass in dieses Material eingelagerte Moleküle nicht mehr freigesetzt werden. Erst durch die hydrolytische Zersetzung des Avidins durch die Protease Trypsin oder durch die Zerstörung des Biotin-Avidin-Komplexes durch Erhitzen auf 90 °C konnten die Poren wieder geöffnet werden, sodass die Gastmoleküle herausdiffundieren konnten.^[433]

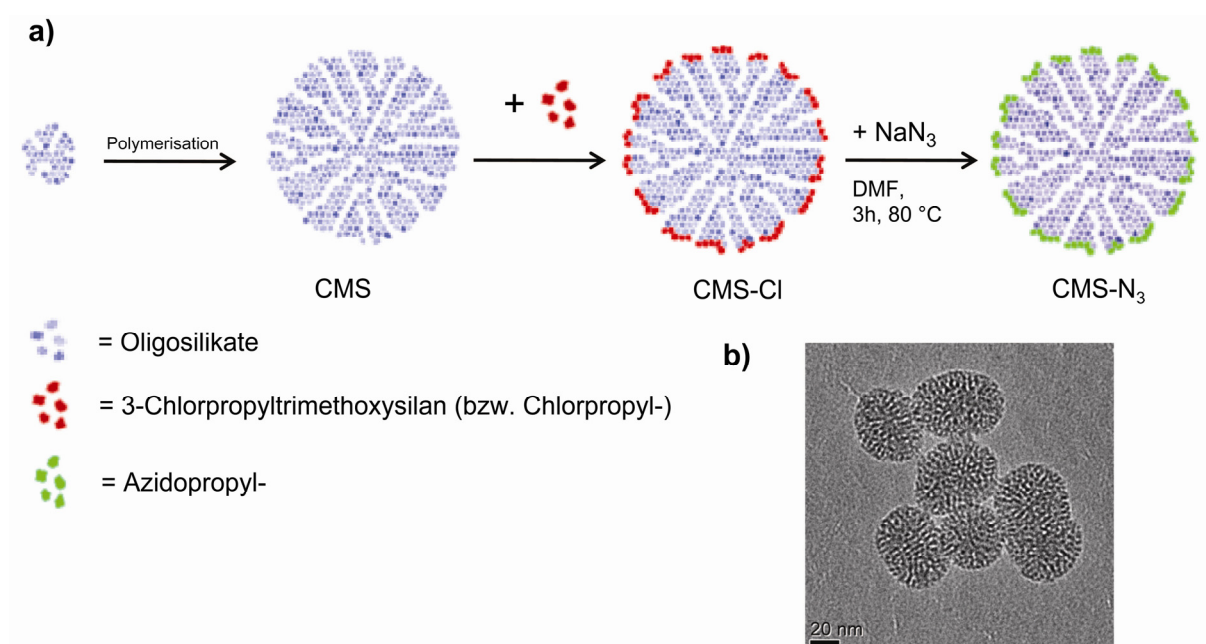
In dem hier beschriebenen Projekt sollte zusammen mit A. Schlossbauer (Arbeitskreis *Bein*) ein Kappensystem für mesoporöse Silikananopartikel entwickelt werden, mit dem es durch Temperaturerhöhung gelingen sollte, in dieses Material

eingelagerte Moleküle kontrolliert freizusetzen. Die Öffnungstemperatur sollte dabei kleiner als die oben erwähnten 90 °C sein. Die Synthese der mesoporösen Nanopartikel sowie die spektroskopischen Untersuchungen wurden von A. Schlossbauer durchgeführt (siehe Anhang).

6.3.2 Synthese des Kappensystems und Experimente zur temperaturbasierten Öffnung

In der Arbeitsgruppe *Bein* wurde eine Synthese entwickelt, mit der CMS Material selektiv an der Oberfläche funktionalisiert werden kann.^[434] Durch einen Kokondensationsprozess mit 3-Chlorpropyltrimethoxysilan und anschließender nukleophiler Substitution des Chlors durch Azid konnten mesoporöse Silikananopartikel mit Azid-modifizierten Oberflächen hergestellt werden (Schema 6.5).^[435] Die Partikel besaßen eine Größenverteilung um 85 nm, Stickstoff-Sorption ergab Porengrößen von 4 nm und ein Porenvolumen von 0.76 cm³g⁻¹. In einem ersten Versuch sollte ein Oligonukleotid bestehend aus 11 Nukleobasen und einer endständigen Alkin-modifizierten Base **40** durch Click-Chemie an die CMS-Oberfläche konjugiert und anschließend mit seinem Gegenstrang hybridisiert werden. Um sowohl die erfolgte Zykloaddition der DNA an die Azidgruppen der Partikel als auch die Hybridisierung der Oligonukleotide detektieren zu können, wurden die DNA-Stränge mit einem FRET-Paar (Förster-Resonanz-Energie-Transfer) ausgestattet, bestehend aus einem Cy3 am 3'-Ende des Alkin-modifizierten Strangs und Fluorescein am 5'-Ende des zu hybridisierenden Gegenstrangs (vgl. Abb. 6.4 c)).





Schema 6.5 a) Synthese von CMS-Partikeln mit Azid-modifizierter Oberfläche durch einen Kokondensationsprozess mit 3-Chlorpropyltrimethoxysilan. **b)** TEM-Aufnahme von CMS-N₃-Partikeln.

Nach erfolgter Click-Reaktion und anschließendem Waschgang konnte die Fluoreszenz von Cy3 auf den Partikeln detektiert werden. Allerdings konnte kein FRET von Fluorescein auf Cy3 nach der Hybridisierung mit dem Gegenstrang beobachtet werden. Da die Waschlösung immer noch eine intensive Gelbfärbung zeigte, stand fest, dass die Hybridisierung der Stränge fehlgeschlagen war.

Im nächsten Versuch wurden die Oligonukleotide zuerst hybridisiert und dann die erhaltene doppelsträngige DNA durch CuAAC an die Oberfläche konjugiert. Der Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer von Fluorescein auf Cy3 war nun eindeutig nachweisbar. Durch Erhöhung der Temperatur auf 40 °C schmolzen die Doppelstränge wieder auf und das FRET-Signal verschwand (vgl. Abb. 6.4 a) und b)).

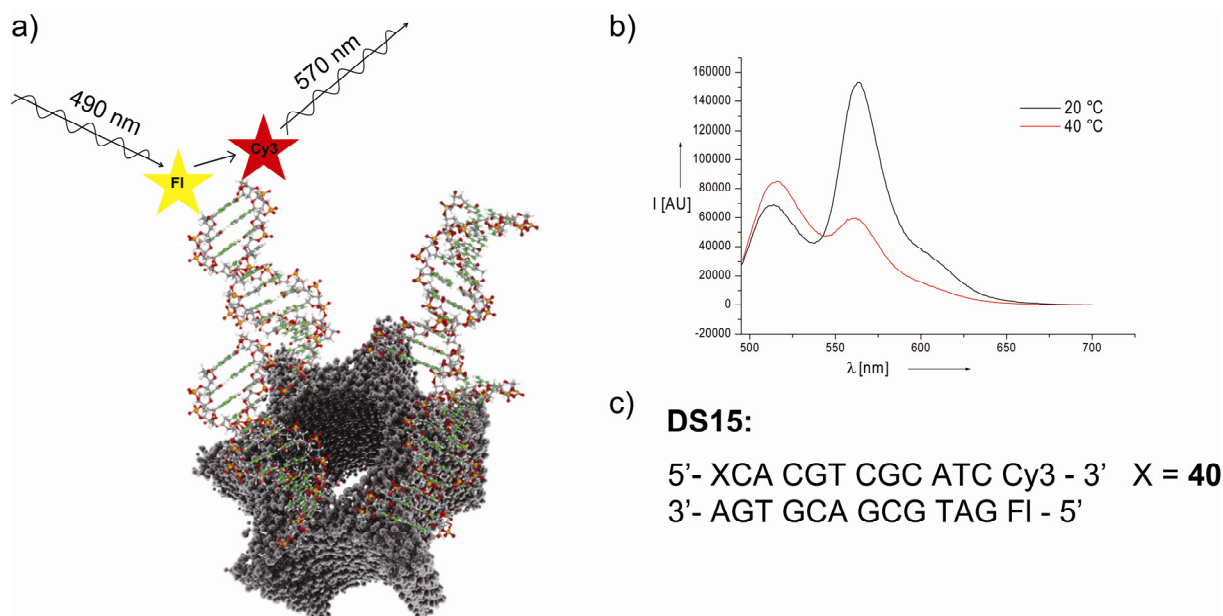
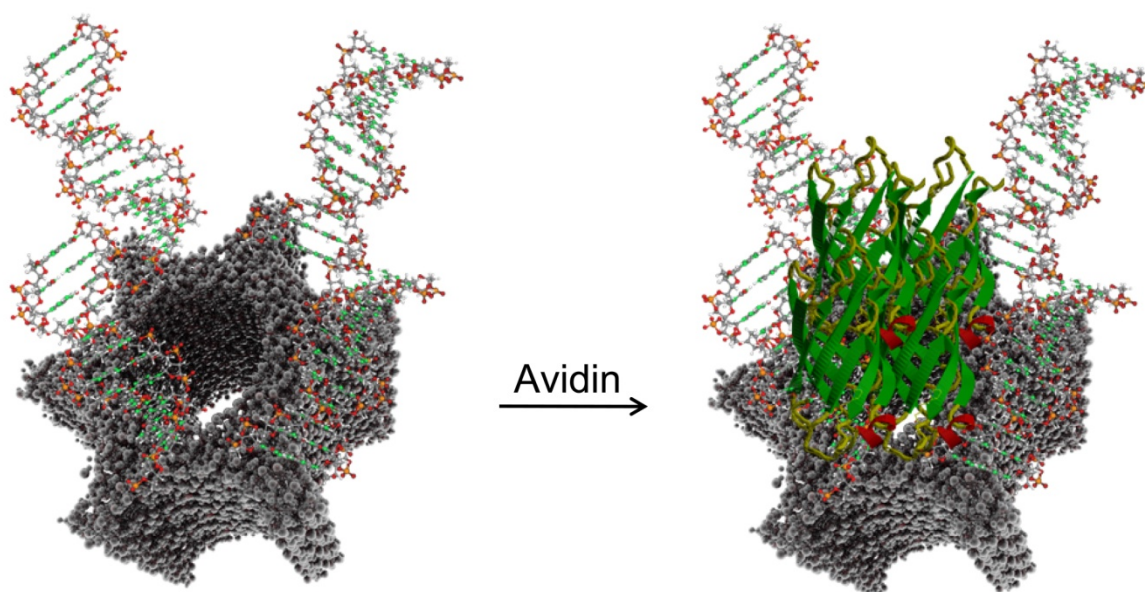


Abbildung 6.4 a) Ausschnitt einer mit DNA funktionalisierten Pore an der Oberfläche eines CMS-Partikels und Schema des FRET-Transfers des an die DNA gebundenen Farbstoffpaares Fluorescein und Cy3. **b)** Fluoreszenzspektrum des FRET-Experiments: Bei Belichtung von CMS-DS15 mit einer Wellenlänge von 490 nm wurde Fluorescein angeregt. Die Energie wurde auf Cy3 übertragen und dieses emittierte Licht einer Wellenlänge mit einem Maximum von 570 nm. Wurde die Temperatur auf 40 °C erhöht, schmolz der DNA-Doppelstrang auf und die Energie konnte nicht mehr vom Fluorescein auf Cy3 übertragen werden, was sich in der Abnahme der Intensität des emittierten Lichtes bei 570 nm äußerte. **c)** Sequenz der verwendeten DNA-Stränge. X = Alkin-modifizierte Base **40**.

Um nun ein über die Temperatur steuerbares Kappensystem zu entwickeln, wurde das bereits bekannte Biotin-Avidin-System mit den DNA-funktionalisierten Partikeln kombiniert. Dazu wurden DNA-Doppelstränge verwendet, die wiederum endständig (5'-Ende) mit der Alkin-Base **40** modifiziert waren und am 3'-Ende des komplementären Halbstrangs, welcher nicht kovalent mit der CMS-Oberfläche verknüpft wurde, ein Biotin trugen. Dieses war über einen relativ kurzen Linker mit der DNA verbunden (vgl. Abb. 6.5 b)).

a)



b)

DS16:

3'- CCC GCA TCC GGT TCT ACG CTG CAC X -5'
 5'- GGG CGT AGG CCA AGA TGC GAC GTG AB -3'

DS17:

3'- Cy3-TTT CTA CGC TGC ACX -5'
 5'- Cy5-AAA GAT GCG ACG TGA B -3'

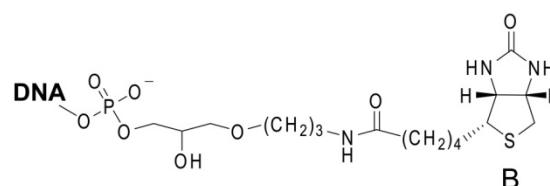


Abbildung 6.5 a) Funktion des Kappensystems: Verschluss einer mit Biotin-DNA funktionalisierten Pore an der Oberfläche eines CMS-Partikels durch Avidin. Avidin besteht aus vier Untereinheiten (Größe jeweils $4.5 \times 5.5 \times 6 \text{ nm}^3$)^[436] welche je ein Biotin binden kann. b) Sequenzen der DNA-Doppelstränge: **DS16** hatte eine Länge von 25 Basen, **DS17** besaß 15 Basen und zusätzlich das FRET-Paar Cy3/Cy5. Rechts unten ist die Struktur des Biotin-Linkers gezeigt.

Damit später die Funktionsfähigkeit des Kappensystems überprüft werden konnte, wurden die Partikel nach der DNA-Konjugation mit einer Fluorescein-Lösung getränkt. Der Farbstoff, der als Modellsubstanz diente, konnte so in die Poren eindringen aber nicht mehr herausdiffundieren, wenn die Poren durch Bindung von Avidin an die Biotin-Funktionen verschlossen wurden (Abb. 6.5 a)). Nach der Zugabe von Avidin wurden die Partikel mehrmals gewaschen, um freie Fluoresceinmoleküle zu entfernen, die sich außerhalb der verschlossenen Poren befanden. Die Endprodukte nach den einzelnen Reaktionsschritten der CMS-

Oberflächenfunktionalisierung wurden durch IR-Spektroskopie charakterisiert (Abb. 6.6).

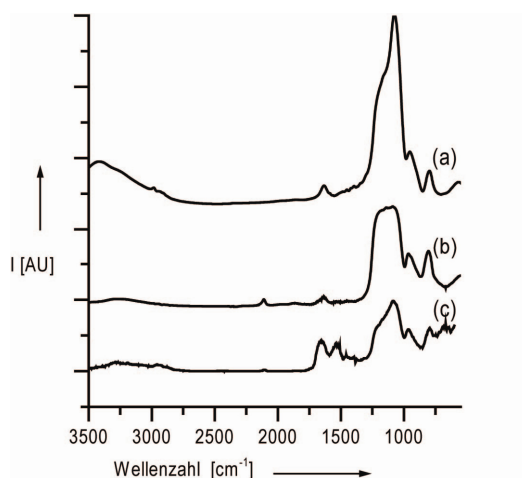


Abbildung 6.6 Infrarot-Spektrum der Substanzen a) CMS-Cl, b) CMS-N₃ und c) CMS-DNA-Avidin.

Während im IR-Spektrum von CMS-Cl (Abb. 6.6 a)) nur die Schwingungen des Silikanetzwerks zu sehen sind, erschien eine deutlich sichtbare Azid-Bande bei 2105 cm⁻¹ in der CMS-N₃ Probe (Abb. 6.6 b)). Diese Bande wurde während der Click-Reaktion sehr stark reduziert, was in Einklang mit der Ausbildung einer kovalenten Bindung über einen Triazolring zwischen der Alkin-modifizierten DNA und der Azid-modifizierten CMS-Oberfläche steht. In Abbildung 6.6 c) sind neben den Banden des Silikagerüsts zusätzliche Schwingungen bei 1551 cm⁻¹ und 1650 cm⁻¹ sichtbar, welche den Amidbindungen des Avidins zugeordnet werden können.

Zur Detektion des freigesetzten Fluoresceinfarbstoffs wurde eine Spezialküvette verwendet, die durch eine Dialysemembran in zwei Kammern geteilt war. Die Membran besaß einen Molekulargewichtsausschluss von 14000 g/mol und war so nur für Fluorescein, nicht aber für das CMS-Material durchlässig (Abb. 6.7).^[433] Durch Fluoreszenzspektroskopie konnte man somit die Freisetzung von Fluorescein aus den Partikeln direkt messen.



Abbildung 6.7 Die Spezialkuvette bestand aus einem 200 μL fassenden Teflonaufsatz a), welcher durch eine Dialysemembran b) verschlossen wurde. Dieser so verschlossene Aufsatz wurde auf eine Fluoreszenzkuvette c) gesetzt.

Nachdem die mesoporösen Silikapartikel mit dem Farbstoff beladen und mit Avidin verschlossen wurden, konnte bei Raumtemperatur selbst nach mehreren Stunden kein Fluoreszenzsignal detektiert werden, was bedeutete, dass die Poren dicht verschlossen blieben und die eingelagerten Fluoresceinmoleküle nicht austreten konnten. Umgekehrt trat der Farbstoff innerhalb von wenigen Minuten komplett aus, wenn die Poren nicht verschlossen wurden. Durch Erhöhung der Temperatur in der Kuvette sollten die DNA-Doppelstränge des CMS-DNA-Avidins aufschmelzen und somit die Poren wieder öffnen, da der DNA-Strang mit dem Biotin-Avidin-Komplex nicht kovalent an die Partikeloberfläche gebunden war (Abb. 6.8).

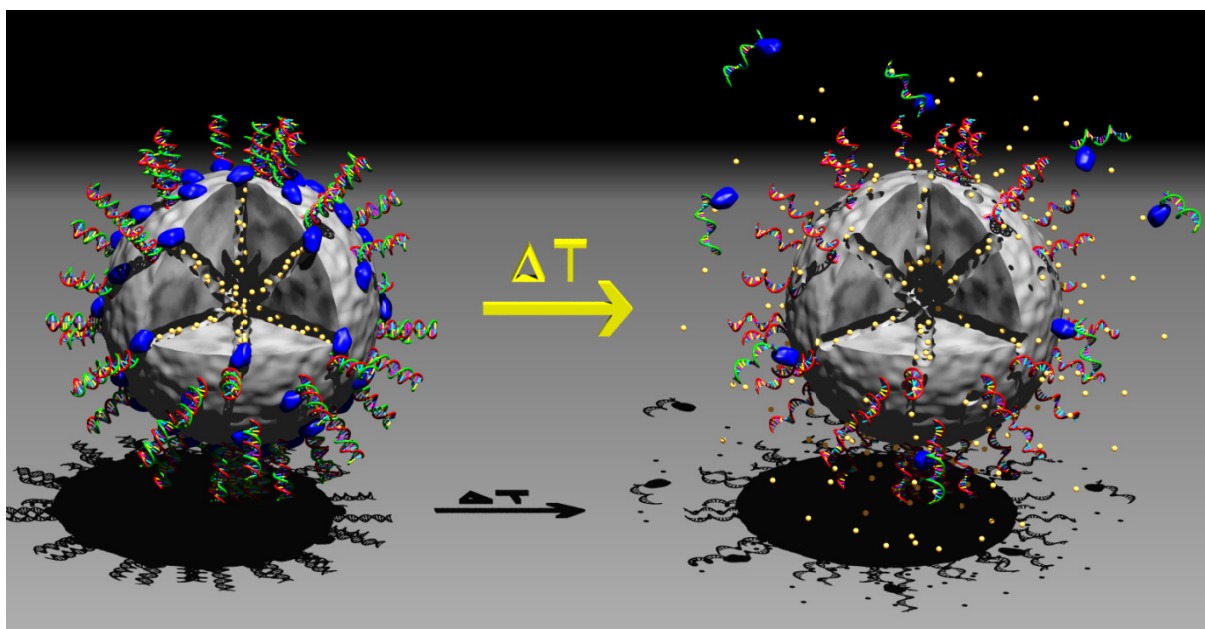


Abbildung 6.8 Temperaturabhängige Öffnung der mit DNA-Biotin-Avidin verschlossenen Silikananopartikel. Nach dem Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge kann eingelagertes Fluorescein wieder austreten.

Im Arbeitskreis *Bein* konnte gezeigt werden, dass sich ein Biotin-Avidin-Komplex, bei welchem das Biotin direkt an die CMS-Oberfläche gebunden war, bei einer Temperatur von 90 °C auflöste und die eingelagerten Moleküle aus den Poren austreten konnten. Durch Variation der Länge der DNA Doppelstränge sollte es daher möglich sein, die Temperatur, die zur Öffnung der Poren benötigt wird, herabzusetzen und diese so auch steuern zu können.

Die Doppelstränge **DS16** und **DS17** besaßen 25 bzw. 15 Basenpaare. Zusätzlich enthielt **DS17** das FRET-Farbstoffpaar Cy3/Cy5, um die Öffnung des DNA-Duplex verfolgen zu können, da die Partikel mit Fluorescein beladen wurden und somit das FRET-Signal bei der Farbstoffkombination Cy3/Fluorescein gestört würde (vgl. Abb. 6.5 b)). Unter langsamem Erwärmen der Partikel wurde die Fluoreszenz des austretenden Farbstoffs in der Fluoreszenzküvette gemessen (Abb. 6.9 a) und b)). Während sich die Poren der Partikel, die mit **DS16**-Avidin modifiziert waren, erst bei 65 °C öffneten, konnten die Fluoresceinmoleküle, die in CMS-**DS17**-Avidin eingelagert waren, bereits bei einer Temperatur von 45 °C freigesetzt werden (Abb. 6.9 c)). Das Aufschmelzen der DNA-Duplexe war ebenfalls deutlich anhand des abnehmenden FRET-Signals bei 670 nm detektierbar (Abb. 6.9 d)).

Die Quantifizierung des ausgetretenen Fluoresceinfarbstoffs erfolgte durch UV/Vis-Spektroskopie. Nach Aufnahme einer Kalibriergeraden konnte eine Menge von 0.033 mg Fluorescein pro mg Partikel für CMS-**DS17**-Avidin und 0.040 mg Fluorescein pro mg Partikel für CMS-**DS16**-Avidin ermittelt werden.

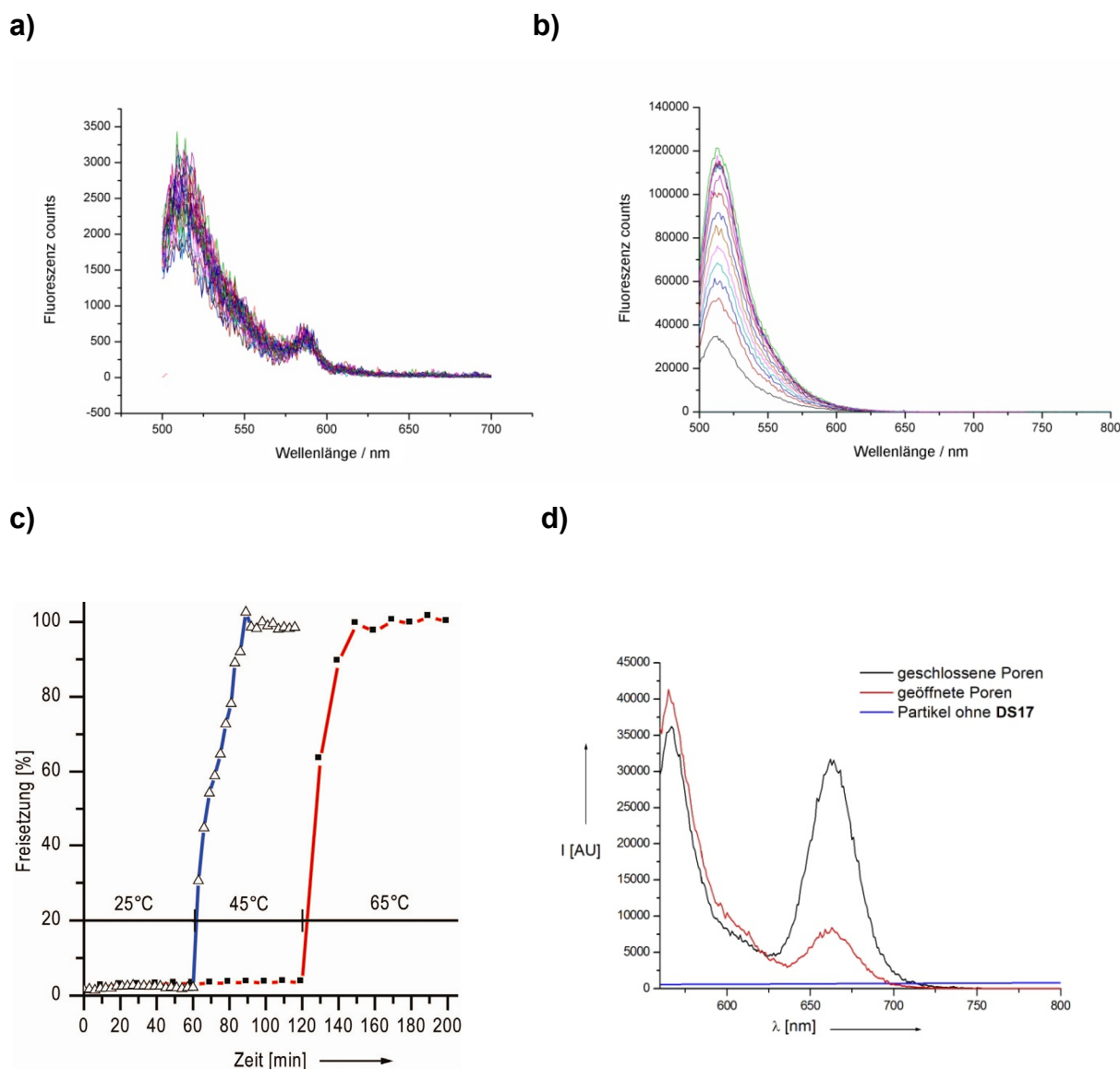


Abbildung 6.9 a) Serie der Fluoreszenz-Emissionsspektren von CMS-DS17-Avidin bei 25 °C. Die Daten wurden 1 h in 5 min Intervallen aufgenommen. b) Serie der Fluoreszenz-Emissionsspektren von CMS-DS17-Avidin bei 45 °C. Die Aufnahmen der Spektren erfolgte alle 2 min. c) Freisetzung von Fluorescein aus den Partikeln CMS-DS16-Avidin (schwarze Vierecke) und CMS-DS17-Avidin (Dreiecke). Alle Werte wurden auf die maximal detektierte Fluoreszenz der jeweiligen Probe normiert, wobei beide Proben eine vergleichbare Menge an geladenem Fluorescein aufwiesen. Während die Poren von CMS-DS16-Avidin bei 45 °C noch komplett verschlossen vorlagen, konnten die eingelagerten Fluoresceinmoleküle aus CMS-DS17-Avidin innerhalb weniger Minuten komplett austreten. d) Fluoreszenzspektrum des FRET-Experiments: Bei Belichtung von CMS-DS17-Avidin mit einer Wellenlänge von 550 nm wird Cy3 angeregt. Die Energie wird auf Cy5 übertragen und dieses emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 670 nm. Wird die Temperatur auf 45 °C erhöht, schmilzt der DNA-Doppelstrang auf und die Energie kann nicht mehr auf Cy5 übertragen werden, was sich in der Abnahme der Intensität des emittierten Lichtes bei 670 nm äußert.

6.3.3 Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick

Das vorgestellte Projekt beschreibt die Synthese eines neuartigen, temperaturabhängigen Kappensystems für mesoporöse, kolloidale Silikapartikel. Es konnte gezeigt werden, dass doppelsträngige DNA mit einer Alkinfunktion über Click-Chemie kovalent an die Azid-modifizierte Oberfläche der Partikel gebunden werden kann. Um in die Poren der CMS-Partikel eingelagertes Fluorescein, welches als Modellsubstanz diente, sicher zu verschließen, wurden die zu den kovalent gebundenen DNA-Einzelsträngen komplementären Oligonukleotide mit einer Biotinfunktion ausgestattet, an die Avidin binden konnte. Avidin wirkte als Kappe und konnte die Poren vollständig verschließen, so dass auch nach mehreren Stunden kein Fluoresceinverlust detektiert werden konnte. Die Temperatur, bei der die Poren durch das Aufschmelzen der DNA-Duplexe wieder geöffnet wurden und der eingelagerte Farbstoff austreten konnte, ließ sich über die Länge der verwendeten Oligonukleotide steuern. Bei einer Länge von 15 Basenpaaren reichte für CMS-**DS17**-Avidin bereits eine Temperatur von 45 °C aus, während das 25mer CMS-**DS16**-Avidin eine Temperatur von 65 °C benötigte.

In weiterführenden Experimenten müsste nun geklärt werden, ob diese modifizierten Silikapartikel dazu verwendet werden können, Moleküle in Zellen zu transportieren und dort gezielt freizusetzen. Durch entsprechendes Design der Oligonukleotide könnte das System derart abgestimmt werden, dass bereits eine Temperaturerhöhung von wenigen Grad Celsius eine Ausschüttung bewirkt. Solche Transportsysteme könnten möglicherweise in Zukunft dazu genutzt werden, Medikamente *in vivo* zu transportieren, ohne dass diese metabolisiert werden, und sie spezifisch nur am gewünschten Wirkort freizusetzen.

7 Experimenteller Teil

7.1 Organisch–chemische Synthese

7.1.1 Material und Methoden

Allgemeines: Sauerstoff- oder feuchtigkeitsempfindliche Reaktionen wurden in mehrfach ausgeheizten und mit Argon rückbefüllten Schlenkkolben durchgeführt. Falls notwendig (z. B. bei Phosphoramiditsynthesen), wurden die Reaktionslösungen vor dem Start der Reaktion durch mehrfaches Einfrieren mit Flüssigstickstoff, Auftauen unter Hochvakuum und Rückbefüllen mit Argon von Sauerstoff befreit. Das Molekularsieb wurde vor der Verwendung mit Wasser staubfrei gewaschen, 3–4 Tage im Trockenschrank vorgetrocknet und dann unter Hochvakuum im Sandbad (ca. 350 °C) für mindestens 12 h getrocknet. Zum Entfernen von Lösungsmitteln *in vacuo* wurde ein Laborota 4001-efficient Rotationsverdampfer der Firma *Heidolph* verwendet, welcher mit einem Vario PC2001-Membranpumpenstand der Firma *Vacuubrand* ausgestattet war. Zur Feintrocknung *in vacuo* wurde eine Ölvakuumpumpe RZ-4 der Firma *Vacuubrand* verwendet (Endvakuum 10^{-2} - 10^{-3} mbar). Zur Lyophilisierung wässriger Lösungen stand eine Alpha 2-4 Lyophile der Firma *Christ* zur Verfügung.

CD-Spektroskopie (Zirkulardichroismus-Spektroskopie) an DNA-Duplexen wurde mit einem *J 810* Spektropolarimeter der Firma *Jasco* durchgeführt, welches mit einem *CDF 426 S Temperature Controller* ausgestattet war. Es wurden spannungsfreie Küvetten der Fa. *Hellma* mit einem Innendurchmesser von 1 cm und einer Schichtdicke von 1 cm verwendet. Die gemessenen Oligonukleotidlösungen besaßen eine Konzentration von 3 μ M (Gesamtvolumen 1 mL) in einer wässrigen Pufferlösung (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4).

Dünnschichtchromatographie (DC) wurde auf Aluminium-Fertigplatten der Firma *Merck* (Kieselgel-60, F₂₅₄-Dünnschicht, 5 cm × 10 cm) bzw. Polyester- (Polygram SILG/UV₂₅₄, 4 cm × 8 cm) und Aluminium-Fertigplatten (Alugram RP-18W/UV₂₅₄, 4 cm × 8 cm) der Firma *Macherey-Nagel* durchgeführt. Zur Sichtbarmachung der

Substanzen wurden die Platten unter UV-Licht betrachtet ($\lambda = 254$ nm bzw. 366 nm) bzw. mit Anisaldehyd-Tauchreagenz (0.5 mL Anisaldehyd in 50 mL Eisessig und 1 mL konz. Schwefelsäure, Platte auf 100 °C erwärmen) oder *Yellow Spray* (800 mL Schwefelsäure [10 %], 120 g Ammoniummolybdat $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$, 5 g Cerammoniumnitrat $[(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6]$, Platte auf 100 °C erwärmen) angefärbt.

Enzymatischer Totalverdau von Oligonukleotiden zur Bestimmung ihrer Zusammensetzung per HPLC-MS/MS wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt: Der zu verdauenden Oligonukleotidlösung (100 μL , 20 μM) wurden 10 μL eines Puffers (300 mM Ammoniumacetat, 100 mM CaCl_2 , 1 mM ZnSO_4 , pH 5.7) zugesetzt. Die Lösung wurde mit 22 *units* Nuklease P1 (*Penicillium citrum*) sowie 0.05 *units* calf spleen-Phosphodiesterase versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 3 h bei 37 °C inkubiert. Es wurden 12 μL eines zweiten Puffers (0.5 M Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) zugesetzt. Anschließend wurden 10 *units* alkaline calf intestinal-Phosphatase sowie 9 *units* snake venom-Phosphodiesterase hinzugegeben und die Lösung weitere 3 h bei 37 °C inkubiert. Die Lösung wurde 30 min bei 13000 rpm zentrifugiert und 30 μL für HPLC-MS/MS-Messungen abgenommen. Der Gradient betrug hier 0 \rightarrow 12 min; 0 % \rightarrow 3 % B; 12 \rightarrow 60 min; 3 % \rightarrow 60 % B; 60 \rightarrow 62 min; 60 % \rightarrow 100 % B; 62 \rightarrow 90 min; 100 % B; 90 \rightarrow 95 min; 100 % \rightarrow 0 % B; 95 \rightarrow 130 min; 0 % B.

Fluoreszenz-Spektren wurden mit einem *FP-750* Spektrofluorometer der Firma Jasco mit Peltier-Element aufgenommen. Für die Messung wurden Fluoreszenzküvetten (*Helma*) mit 2 mm Innendurchmesser und 10 mm Strahlengang (Probenvolumen bis 500 μL) verwendet. Austretendes Fluorescein aus den Silikapartikeln wurde mit einem PTI Fluoreszenzsystem mit einem PTI 814 *photomultiplier detector* und einer PTI A1010B Xenonlampe detektiert. Für die Temperatureinstellungen wurde ein Quantum Northwest TC 125 *sample holder* verwendet. Die Dialysemembran (*ROTH*) Visking Typ 8/32 besaß einen Molekulargewichtsausschluss von 14000 g/mol.

HPL-Chromatographie wurde auf verschiedenen Anlagen von *Merck-Hitachi* bzw. *Waters* durchgeführt. Die Komponenten waren im Einzelnen: *Merck*_{analytisch}: L-7100 Pumpe, L-7200 *Autosampler*, L-7400 UV-Detektor, L-7480 Fluoreszenzdetektor; *Merck*_{präparativ}: L-7150 Pumpe, L-7200 *Autosampler*, *Rheodyne* P/N 77 25i Ein-

spritzventil, L-7420 UV/Vis-Detektor, L-7350 Säulenofen, ERC-3415 Lösungsmittel Entgaser; *Waters*_{analytisch}: 2996 *Diode Array Detector*, 2695 *Separation Module*; *Waters*_{präparativ}: 1525 *HPLC Pump*, 2487 *Dual Wavelength UV Detector*. Für analytische *reversed-phase*-Trennungen wurden CC 250/4 *Nucleosil 120-3 C18*- und VP 250/4 *Nucleodur 100-3 C18 ec*-Säulen der Fa. *Macherey-Nagel* verwendet. Für präparative Trennungen wurden VP 250/10 *Nucleodur 100-5 C18 ec*- und VP 250/10 *Nucleosil 100-7 C18*-Säulen eingesetzt. Als Puffersystem wurden 0.1 M Triethylammoniumacetat in Wasser (Puffer A) und 0.1 M Triethylammoniumacetat in 80 % Acetonitril (Puffer B) verwendet (in den Methoden jeweils als A oder B bezeichnet). Zur Trennung der Nukleoside nach enzymatischem Totalverdau von Oligonukleotiden wurde eine *MS Uptisphere 3HDO* der Fa. *Interchrom* verwendet. Als Puffersystem diente 2 mM Triethylammoniumformiat in Wasser (Puffer A) und 2 mM Triethylammoniumformiat in 80 % Acetonitril (Puffer B). Die Flussrate betrug hier nur 0.15 mL/min. Das benötigte Wasser wurde durch eine Milli-Q Plus Anlage der Firma *Millipore* von Verunreinigungen und Salzen befreit. *Gradient Grade* Acetonitril wurde von den Firmen *Fisher* oder *VWR*, alle sonstigen Chemikalien (z. B. Salze und Reagenzien für Puffer) von der Firma *Fluka* (Qualität Biochemika) bezogen.

IR-Spektren wurden auf einem *Perkin-Elmer FT-IR Spectrum 100* Spektrometer aufgenommen, welches mit einer ATR-Einheit (Totalreflexionsverfahren) ausgestattet war. Die Lage der Banden ist in cm^{-1} angegeben, die relativen Intensitäten sind mit den Symbolen vs (sehr stark), s (stark), m (mittel) und w (schwach) gekennzeichnet.

Kernresonanzspektren (NMR) wurden auf den Geräten *Bruker DRX 200*, *Bruker AMX 300*, *Bruker AMX 400*, *Bruker AMX 500*, *Bruker ARX 600*, *Varian Oxford 200* und *Varian XL 400* aufgenommen. Die Aufnahme erfolgte bei Raumtemperatur, die Messfrequenz in MHz sowie das Lösungsmittel sind in Klammern vermerkt. Die chemische Verschiebung δ ist in ppm relativ zu Tetramethylsilan ($\delta = 0$) angegeben. Kopplungskonstanten J wurden mit Hilfe der Software *MestRes* (*Mestrelab Research*) bestimmt und sind in Hz angegeben. Die Signalmultiplizitäten sind mit den Symbolen s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett), q (Quadruplett), m (Multipllett) sowie ggf. deren Kombinationen gekennzeichnet.

Konzentrationsbestimmungen von Oligonukleotiden wurden an einem Nanodrop Photospektrometer (*Nanodrop Technologies*) bestimmt. Die Extinktionskoeffizienten der Oligonukleotide wurden durch Addition der Extinktionskoeffizienten der Einzelbasen berechnet. Diese betragen: dA 15.0 L/mmol·cm, dC 7.1 L/mmol·cm, dG 12.0 L/mmol·cm, dT 8.4 L/mmol·cm, Fluorescein 13.7 L/mmol·cm, Cy3 5.0 L/mmol·cm. Die Extinktionskoeffizienten von dC^F und dC^M entsprechen in erster Näherung dem von dC.

Lösungsmittel und Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in den kommerziellen Qualitätsstufen *puriss.*, *p.a.* oder *purum* eingesetzt und von den Firmen *Fluka*, *Acros*, *Aldrich*, *Lancaster* oder *Sigma* bezogen. Bidestilliertes Wasser (Impedanz 18.2 MΩ) wurde mit einer Milli-Q Plus Anlage der Firma *Millipore* erzeugt. Trockene Lösungsmittel wurden von den Firmen *Fluka*, *Acros*, oder *Aldrich* bezogen, Lösungsmittel für Extraktionen und Säulenchromatographie waren von technischer Qualität und wurden vor Verwendung destilliert.

Massenspektren (MS) wurden auf den Geräten *Finnigan* MAT 95 Q (EI, FAB), *Finnigan* LTQ-FT (ESI, APCI), *Finnigan* TSQ 7000 (ESI), *Finnigan* MAT 95 S (ESI), *Applied Biosystems* Q-Star Pulsar i (ESI) und *Finnigan* MAT 90 (EI, FAB) gemessen. Hochauflösende Massenspektren (HRMS) wurden auf den Geräten *Finnigan* LTQ-FT (ESI, APCI), *Applied Biosystems* Q-Star Pulsar i (ESI) und *Finnigan* MAT 95 S (ESI) gemessen. Für die ESI Messung von DNA Proben wurden diese 2 h durch Dialyse auf Membranfiltern (MF *Membrane Filters*, Porengröße 0,025 µm) der Firma *Millipore* entsalzt, vollständig lyophilisiert und in 10 mM NH₄OAc, 25 mM Piperidin und 25 mM Imidazol zu einer DNA Konzentration von mind. 60 µM aufgenommen. MALDI-TOF-Massenspektren wurden auf einem *Bruker* Autoflex II gemessen. Als Matrix für kleine Moleküle wurden wahlweise gesättigte Lösungen von Sinapinsäure, 6-Aza-2-thiothymin (ATT) und 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) in 1:1 Wasser/Acetonitril verwendet. Für MALDI Messungen von DNA Proben wurden diese zunächst ebenfalls auf Membranfiltern 30 min - 1 h oder über *ZipTip*TM (*Millipore*) entsalzt und mit 3-Hydroxypicolinsäure (HPA) gemessen (50 mg HPA, 10 mg Diammoniumhydrogencitrat, 10 µL 15-Krone-5 in 1 mL H₂O).

Oligonukleotidsynthesen wurden auf einem *ÄKTA-oligoplot* System der Fa. *Amersham Biosciences* im 2 µmol Maßstab durchgeführt. Die geschützten Amidite sowie die Nukleosid-, Biotin- und Cholesteryl-beladenen CPG-Träger wurden von der Firma *Glen Research* bezogen. Phosphoramidite (0.1 M) und Aktivator (Benzylthiotetrazol (BTT) 0.25 M) wurden in Acetonitril der Fa. *Riedel de Haen* (Wassergehalt < 0.1 ppm) gelöst, für die übrigen Reagenzien wurde Acetonitril der Fa. *Roth* (Wassergehalt < 0.3 ppm) als Lösungsmittel verwendet. Alle hergestellten Lösungen wurden vor der Synthese mind. 12 h über Molekularsieb 3 Å getrocknet. Die Synthese natürlicher Oligonukleotide erfolgte nach Standardprotokollen des Geräteherstellers, Stränge mit Phosphorothioatrückrat und Stränge ohne Sonderbasen wurden von den Firmen *Metabion* und *IBA* bezogen. Folgende Lösungen wurden eingesetzt: *Capping A*: 20 % Acetanhydrid, 50 % Acetonitril, 30 % Lutidin; *Capping B*: 20 % *N*-Methylimidazol in Acetonitril; Oxidation: 0.025 M Iod (650 mg Iod in 65 mL Acetonitril, 30 mL Wasser und 6 mL Lutidin); Detritylierung: 3 % Dichloressigsäure in Toluol. Nach der Synthese wurde die feste Phase am HV getrocknet und anschließend jeweils die Hälfte vorsichtig aus der Kartusche in ein *Eppendorf*-Reaktionsgefäß (1.5 mL) überführt. Zur Abspaltung der DNA und Entfernung der Schutzgruppen wurde diese mit einer Lösung aus ges. Ammoniak in Wasser und Ethanol 3:1 (1.2 mL) versetzt und 24 h bei RT in einem Thermoschüttler der Fa. *Eppendorf* unter mäßigem Schütteln inkubiert. Das Ammoniak/Ethanol-Gemisch wurde mit Stickstoff abgeblasen und der Rückstand in Wasser (800 µL) aufgenommen. Die Reinigung der DNA erfolgte durch RP-HPLC, wobei in der Regel ein Gradient von 0-40 % B in 45 min gefahren wurde. Bei lipophileren DNA Strängen (z. B. Cholesteryl-funktionalisierte Oligos) musste der Gradient entsprechend steiler sein (0-50 % und mehr). In den meisten Fällen wurde die DNA zweimal per RP-HPLC getrennt, um die gewünschte Reinheit zu gewährleisten. Anschließend wurden die einzelnen Fraktionen an der *SpeedVac* eingeeengt, durch MALDI-TOF-MS identifiziert und die saubere DNA mit Hilfe von *SepPak*TM C₁₈-Säulen der Firma *Waters*, Abmessungen 9×10 mm, entsalzt. Die Säulen wurden zunächst mit Acetonitril (10 mL) benetzt und mit Wasser (20 mL) konditioniert. Anschließend wurde die wässrige DNA-Lösung langsam aufgezogen und mit 20 mL Wasser gewaschen. Die DNA wurde dann mit 5 mL Acetonitril/Wasser 4:1 von der Säule eluiert. Die Lösungen wurden mittels einer *SpeedVac* bis zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 200 µL Wasser aufgenommen. Nach Bestimmung der Reinheit

durch analytische RP-HPLC und MALDI-TOF-MS sowie Konzentrationsbestimmung (s.o.) wurden die DNA Stränge mit äquimolaren Mengen ihrer Gegenstränge sowie 10 % Hybridisierungspuffer (500 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl) vermischt, 5 min auf 90 °C erhitzt und langsam über Nacht auf RT abgekühlt.

Peptidsynthese wurde manuell in 10 mL Spritzen mit Filtereinsatz (*BD DiscarditTM*) der Firma *Becton Dickinson* durchgeführt. Es wurde mit trockenen Lösungsmitteln (Wassergehalt < 0.005 % (DCM), < 0.020 % (NMP, aminfrei)) bei RT gearbeitet. Das mit Fmoc-D-Arg(Pmc) vorbeladene Trägermaterial sowie Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH wurden von der Firma *Bachem* bezogen. Zur Mischung der Komponenten während der Synthese wurde die Spritze an einem KPG-Rührer befestigt und rotierte auf der langsamsten Stufe. Zur Synthese siehe Kapitel 7.1.6.

Säulenchromatographie wurde bei Normaldruck oder unter leichtem N₂-Überdruck durchgeführt. Es wurde Kieselgel 60 (Korngröße 40-63 µm) der Firma *Merck* verwendet. Bei säureempfindlichen Produkten wurde das Kieselgel durch Rühren im jeweiligen Lösungsmittel unter Zusatz von 1 % Pyridin für mind. 4 h deaktiviert. Die Lösungsmittel waren von technischer Qualität und wurden vor der Verwendung destilliert, Chloroform und Dichlormethan unter Zusatz von Kaliumhydrogencarbonat. Die entsprechende Zusammensetzung der Lösungsmittelgemische ist im Text angegeben.

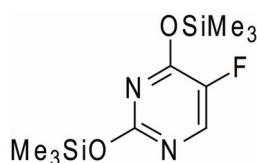
Schmelzpunkte von Oligonukleotiden wurden auf einem *Varian Cary 100 Bio* mit Temperaturcontroller, Transporteinheit und *MultiCellBlock* aufgenommen. Der Temperaturgradient betrug 0.5 °C/min. Es wurden pro Messung je 5 Abkühlkurven (85 °C → 0 °C) und 5 Aufheizkurven (0 °C → 85 °C) bei 260 nm und 320 nm aufgenommen. Der Probenraum wurde während der Messung mit Stickstoff gespült, um ein Anlaufen der Küvetten bei tiefen Temperaturen zu verhindern. Es wurden Küvetten der Fa. *Hellma* mit 4 mm Innendurchmesser und 10 mm Strahlengang verwendet. Für die Schmelzkurven wurden 3 µM DNA-Duplexlösungen angesetzt, welche zusätzlich 150 mM NaCl und 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) enthielten. In den Küvetten wurden die Lösungen mit Dimethylpolysiloxan überschichtet, um ein Verdampfen der Probe zu verhindern. Die Auswertung der Messungen erfolgte unter Verwendung von *Microcal Origin*. Dazu wurden die erhaltenen Kurven bei 260 nm

gemittelt und hiervon die gemittelte Hintergrundmessung bei 320 nm subtrahiert. Die so erzeugte Kurve wurde durch ein Polynom 9. Ordnung approximiert. Die Nullstelle der 2. Ableitung der Näherungsfunktion stellte den gesuchten Schmelzpunkt dar.

UV-Vis-Spektren wurden auf einem *Varian* Cary 100 Bio Spektrometer mit Temperaturcontroller, Transporteinheit und *Multicellblock* aufgenommen. Es wurden Quarzküvetten der Firma *Helma* verwendet, welche 4 mm Innendurchmesser, 10 mm Strahlengang und ein Innenvolumen von 1 mL besaßen.

7.1.2 Synthese des dC^F-Bausteins 11

5-Fluor-2,4-bis(trimethylsilyloxy)-pyrimidin (12)

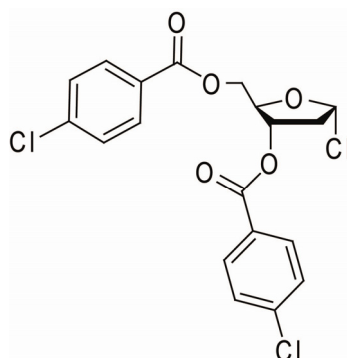


5-Fluoruracil (5.00 g, 38.4 mmol), HMDS (40 mL) und TMSCl (kat.) wurden 3.5 h unter Argon zum Sieden erhitzt. Überschüssiges HMDS wurde anschließend bei 20 mbar und 90 °C entfernt. Nach Destillation erhielt man **12** ($T_s = 120\text{--}121^\circ\text{C}$, $p = 20$ mbar, 6.51 g, 62 %) als farblose Flüssigkeit.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 8.38$ (s, 1H, *HC*), 0.39 (s, 18H, *H*₃C-TMS) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 158.0, 145.8, 145.6, 142.8, 2.4$ (6 C) ppm.

MS (ESI⁺): m/z berechnet für C₁₀H₁₉FN₂O₂Si [M]⁺: 247.1; gefunden: 247.3.

3,5-Bis-O-(p-chlorbenzoyl)-2-desoxy- α -D-ribofuranosylchlorid (13)

Acetylchlorid (300 μ L, 3.44 mmol, kat.) wurde zu einer Lösung aus 2-Desoxy-D-ribose (6.70 g, 49.95 mmol) in Methanol (100 mL) gegeben und 45 min bei RT gerührt. Anschließend wurde Pyridin (10 mL) zugegeben und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in abs. Pyridin (30 mL) gelöst und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Es wurde wieder in abs. Pyridin (30 mL) gelöst und mit einem Eiswasserbad gekühlt. DMAP (0.40 g, 3.27 mmol, kat.) wurde zuerst zugegeben, dann langsam (über 20 min) 4-Chlorbenzoylchlorid (14.0 mL, 109 mmol, 2.18 eq.) zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde 1 h bei 0°C und dann über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktion wurde mit H₂O (100 mL) gequencht und DCM (120 mL) zugegeben. Die organische Phase wurde separiert und die wässrige Phase mit DCM (50 mL) extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen wurden mit ges. NaHCO₃-Lösung (2 \times 100 mL), 2N H₂SO₄ (2 \times 100 mL), H₂O (2 \times 100 mL) und ges. NaCl-Lösung (100 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das sirupöse Gemisch mit Diethylether versetzt. Der ausgefallene farblose Feststoff wurde abfiltriert, am HV getrocknet, dreimal mit Toluol (je 50 mL) versetzt und das Lösungsmittel sogleich wieder *in vacuo* entfernt. Nun wurde in Eisessig (60 mL) gelöst und HCl_g durchgeleitet bis ein leicht rosa Feststoff ausfiel. Das Rohprodukt wurde abfiltriert, mit Diethylether und *i*-Hexan gewaschen bis das Produkt farblos war und anschließend am HV getrocknet. Man erhielt **13** (9.32 g, 43 %) als farblosen Feststoff.

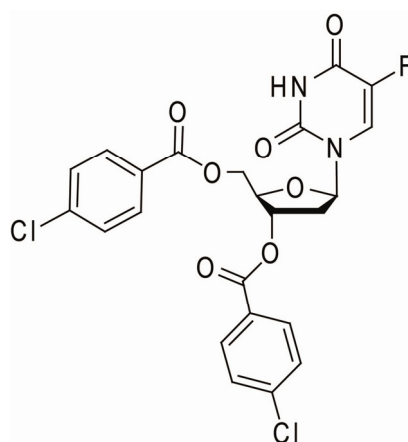
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.03 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, *H*_{arom}C), 7.94 (d, 2H, ³J = 8.4 Hz, *H*_{arom}C), 7.44 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, *H*_{arom}C), 7.42 (d, 2H, ³J = 8.4 Hz, *H*_{arom}C), 6.46 (d, 1H, ³J = 4.8 Hz, HC(1')), 5.54 (dd, 1H, ³J = 3.2 Hz, ³J = 7.2 Hz,

$HC(3')$), 4.84 (dt, 1H, $^3J = 3.2$ Hz, $^3J = 4.4$ Hz, $HC(4')$), 4.68 (dd, 1H, $^3J = 3.2$ Hz, $^2J = 12.0$ Hz, $H_\alpha C(5')$), 4.60 (dd, 1H, $^3J = 4.4$ Hz, $^2J = 12.0$ Hz, $H_\beta C(5')$), 2.85 (ddd, 1H, $^3J = 4.8$ Hz, $^3J = 7.2$ Hz, $^2J = 14.8$ Hz, $H_\alpha C(2')$), 2.73 (d, 1H, $^2J = 14.8$ Hz, $H_\beta C(2')$) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 165.4, 165.1, 140.1, 139.9, 131.2$ (4C), 128.9 (4C), 127.9, 127.8, 95.0, 84.4, 73.8, 63.7, 44.4 ppm.

MS (ESI $^+$): m/z berechnet für $C_{19}H_{15}Cl_3O_5$ $[M]^+$: 427.9; gefunden: 427.9.

5-Fluor-3',5'-bis-*O*-(*p*-chlorbenzoyl)-2'-desoxyuridin (**14**)



13 (7.00 g, 16.36 mmol), **12** (4.90 g, 17.88 mmol, 1.09 eq.) und *p*-Nitrophenol (0.80 g, 5.77 mmol, 0.35 eq.) wurden in trockenem $CHCl_3$ (50 mL) gelöst und für 12 h bei 30°C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und aus Eisessig (80 mL) umkristallisiert. Man erhielt **14** (5.48 g, 49 %) als reines β -Anomer.

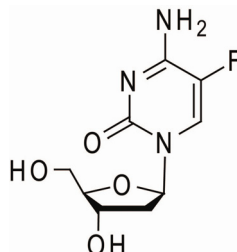
1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): $\delta = 11.89$ (s, 1H, HN), 7.98 (d, 2H, $^3J = 8.8$ Hz, $H_{arom}C$), 7.97 (s, 1H, $HC(6)$), 7.95 (d, 2H, $^3J = 8.8$ Hz, $H_{arom}C$), 7.58 (d, 2H, $^3J = 8.8$ Hz, $H_{arom}C$), 7.54 (d, 2H, $^3J = 8.8$ Hz, $H_{arom}C$), 6.22 (t, 1H, $^3J = 6.4$ Hz, $HC(1')$), 5.58-5.50 (m, 1H, $HC(3')$), 4.64-4.54 (m, 2H, $HC(4')$, $H_\alpha C(5')$), 4.48-4.44 (m, 1H, $H_\beta C(5')$), 2.65-2.46 (m, 2H, $H_{\alpha,\beta} C(2')$) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$): $\delta = 165.3, 165.1, 157.7, 157.5, 149.7, 139.9, 139.7, 131.3$ (2C), 131.2 (2C), 129.6 (4C), 128.7 (2C), 125.7, 85.7, 81.7, 75.4, 65.1, 36.4 ppm.

^{19}F -NMR (376 MHz, $DMSO-d_6$): $\delta = -167.3$ (s, FC) ppm.

MS (MALDI-TOF⁺): m/z berechnet für $C_{23}H_{17}Cl_2FN_2NaO_7$ $[M+Na]^+$: 545.0; gefunden: 545.0.

5-Fluor-2'-desoxycytidin (7)



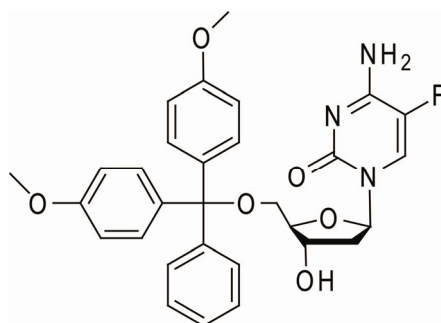
14 (630 mg, 1.21 mmol) wurde dreimal mit abs. Pyridin (je 5 mL) koevaporiert und dann in abs. Pyridin (7 mL) und Tetrazollösung (0.45 mM in MeCN, 15.5 mL) gelöst. 4-Chlorphenylphosphordichloridat (0.40 mL, 2.45 mmol, 2.03 eq.) wurde zugetropft und über Nacht unter Argon gerührt. Die Reaktion wurde mit MeOH (5 mL) gestoppt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in $CHCl_3$ (50 mL) aufgenommen, mit 5%iger $NaHCO_3$ Lösung (2×25 mL) und H_2O (2×25 mL) gewaschen und die wässrige Phase mit 80 mL $CHCl_3$ rückextrahiert. Es wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Nun wurde abs. MeOH (20 mL) und konz. NH_3 (20 mL) zugegeben und zwei Tage bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde *in vacuo* eingeeengt und säulenchromatographisch (Kieselgel-60, Chloroform/Methanol 7:3) gereinigt. Man erhielt das Produkt (200 mg, 67 %) als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 8.04 (d, 1H, 3J = 7.2 Hz, $HC(6)$), 7.68 (s, 1H, HN), 7.45 (s, 1H, HN), 6.08 (t, 1H, 3J = 7.2 Hz, $HC(1')$), 5.15 (d, 1H, 3J = 4.0 Hz, HO), 5.04 (t, 1H, 3J = 5.2 Hz, HO), 4.18-4.16 (m, 1H, $HC(3')$), 3.74 (dt, 1H, $HC(4')$), 3.56-3.53 (m, 2H, $H_{\alpha,\beta}C(5')$), 2.07-2.03 (m, 1H, $H_{\alpha}C(2')$), 1.99-1.94 (m, 1H, $H_{\beta}C(2')$) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 158.1, 153.9, 137.8, 135.5, 126.1, 87.9, 85.8, 70.8, 61.7 ppm.

¹⁹F-NMR (376 MHz, DMSO- d_6): δ = -167.6 (s, FC) ppm.

MS (ESI⁺): m/z berechnet für $C_9H_{13}FN_3O_4$ $[M+H]^+$: 246.1; gefunden: 246.1.

5-Fluor-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin

7 (116 mg, 0.47 mmol) und Dimethoxytritylchlorid (217 mg, 0.64 mmol, 1.36 eq.) wurden in abs. Pyridin (13 mL) gelöst und bei RT 7 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Produkt säulenchromatographisch (deaktiviertes Kieselgel-60, Ethylacetat → Ethylacetat/MeOH 5:1 + 1% Pyridin) gereinigt. Man erhielt das Produkt (163 mg, 63 %) als farblosen Feststoff.

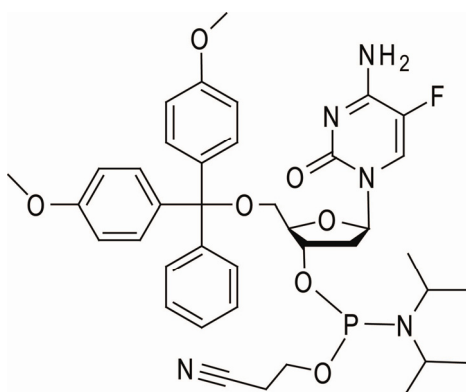
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.93 (d, 1H, ³J = 7.2 Hz, HC(6)), 7.46 (s, 2H, H₂N), 7.39-6.90 (m, 13H, H_{arom}-DMT), 6.08 (dd, 1H, ³J = 6.4 Hz, ²J = 1.6 Hz HC(1')), 5.23 (d, 1H, ³J = 4.4 Hz, HO), 4.22-4.20 (m, 1H, HC(3')), 3.85-3.84 (m, 1H, HC(4')), 3.70 (s, 6H, H₃C-O-DMT × 2), 3.22-3.09 (m, 2H, H_{α,β}C(5')), 2.18-2.08 (m, 2H, H_{α,β}C(2')) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 158.7, 153.8, 150.3 (4C), 145.4, 136.8 (2C), 136.0 (2C), 136.1, 135.9, 130.3, 128.5, 128.3 (2C), 127.3, 124.6 (4C), 113.8 (2C), 86.4, 85.6, 70.8, 64.2, 55.7 (2C) ppm.

¹⁹F-NMR (376 MHz, DMSO-d₆): δ = -167.6 (s, FC) ppm.

MS (MALDI-TOF⁺): *m/z* berechnet für C₃₀H₃₀FN₃NaO₆ [M+Na]⁺: 569.9; gefunden: 570.1.

5-Fluor-4'-O-(cyanoethyl-*N,N*-diisopropylaminophosphanoxy)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin (11)



5-Fluor-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin (353 mg, 0.64 mmol) wurde in abs. DCM (20 mL) gelöst, mit Diisoprylammoniumtetrazolat (114 mg, 0.66 mmol, 1.05 eq.) und 2-Cyanoethyl-*N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphordiamidit (0.50 mL, 1.57 mmol, 2.45 eq.) versetzt und bei RT unter Argonatmosphäre über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Produkt säulenchromatographisch (deaktiviertes Kieselgel-60, Ethylacetat → Ethylacetat/MeOH 5:1 + 1% Pyridin) aufgereinigt. Man erhielt **11** (275 mg, 57 %) als farblosen Schaum.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.80 (d, 1H, 3J = 6.8 Hz, HC(6)), 7.37-7.19 (m, 9H, H_{arom} -DMT), 6.88-6.82 (m, 4H, H_{arom} -DMT), 6.13-6.06 (m, 1H, HC(1')), 4.49-4.40 (m, 1H, HC(3')), 4.03-3.95 (m, 1H, HC(4')), 3.70 (s, 3H, H_3 C-O-DMT), 3.69 (s, 3H, H_3 C-O-DMT), 3.64-3.39 (m, 5H, H_2 C-O-P, HC-N-P × 2, H_{α} C(5')), 3.30-3.29 (m, 1H, H_{β} C(5')), 2.74 (t, 2H, 3J = 5.6 Hz, H_2 C-CN), 2.34-2.17 (m, 2H, $H_{\alpha,\beta}$ C(2')), 1.22-1.12 (m, 12H, CH_3 -CH-N-P × 4) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 172.7, 171.0, 158.8 (4C), 153.8, 136.0, 135.9, 130.4 (2C), 130.2 (2C), 130.1, 128.3 (2C), 127.5, 128.4 (4C), 128.2 (2C), 128.1, 119.4, 86.5, 85.6, 73.5, 63.8, 55.7 (2C), 46.3, 43.3, 25.0, 24.8, 21.8, 21.4, 14.7, 12.2 ppm.

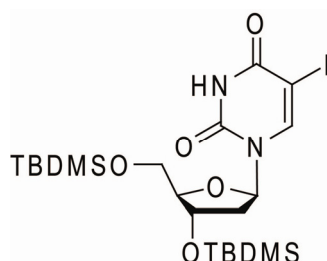
¹⁹F-NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -167.4 (s, FC) ppm.

³¹P-NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 146.7, 146.4 ppm.

MS (ESI): m/z berechnet für C₃₉H₄₆FN₅O₇P [M-H]⁻: 746.3; gefunden: 746.3.

7.1.3 Synthese des Alkin-modifizierten Nukleosids 24

3', 5'-(Bis-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)-5-iod-2'-desoxyuridin



5-Iod-2'-desoxyuridin (15.00 g, 42.40 mmol) wurde in Pyridin (70 mL) gelöst. Imidazol (8.70 g, 127.79 mmol, 3.01 eq.) und *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (19.17 g, 127.20 mmol, 3.00 eq.) wurden zugegeben und die Lösung 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt, das Rohprodukt in Ethylacetat (300 mL) aufgenommen und zweimal mit dest. Wasser (300 mL) gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat und Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo* wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (Kieselgel-60, Isohexan/Ethylacetat 3:1) aufgereinigt. Man erhielt doppelt TBDMS-geschütztes 5-Iod-2'-desoxyuridin (20.03 g, 81 %) als farblosen Schaum.

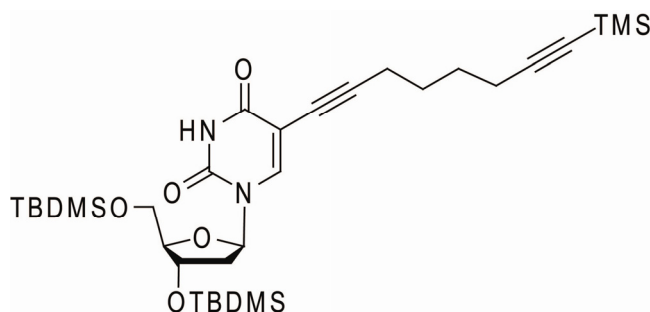
$R_f = 0.38$ (Isohexan).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.26$ (s, 1H, HN), 8.08 (s, 1H, HC(6)), 6.26 (dd, 1H, $^3J = 5.9$ Hz, $^3J = 8.4$ Hz, HC(1')), 4.40-4.38 (m, 1H, HC(3')), 3.99-3.97 (m, 1H, HC(4')), 3.87 (dd, 1H, $^3J = 2.4$ Hz, $^2J = 11.4$ Hz, $H_\alpha\text{C}(5')$), 3.75 (dd, 1H, $^3J = 2.4$ Hz, $^2J = 11.4$ Hz, $H_\beta\text{C}(5')$), 2.29 (ddd, 1H, $^3J = 2.8$ Hz, $^3J = 5.9$ Hz, $^2J = 13.1$ Hz, $H_\alpha\text{C}(2')$), 2.01 (m, 1H, $H_\beta\text{C}(2')$), 0.93 (s, 9H, *t*Bu-TBDMS), 0.88 (s, 9H, *t*Bu-TBDMS), 0.14 (s, 3H, $H_3\text{C-TBDMS}$), 0.13 (s, 3H, $H_3\text{C-TBDMS}$), 0.07 (s, 3H, $H_3\text{C-TBDMS}$), 0.06 (s, 3H, $H_3\text{C-TBDMS}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 159.6, 149.5, 144.4, 88.5, 85.8, 72.6, 68.2, 63.1, 42.0, 26.2$ (3C), 25.7 (3C), 18.5, 18.0, -4.7, -4.9, -5.1, -5.3 ppm.

MS (ESI $^+$): m/z berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{O}_5\text{IN}_2\text{Si}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 583.15; gefunden: 583.15.

3',5'-(Bis-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)-5-(8-trimethylsilyl-okta-1,7-diinyl)-2'-desoxyuridin



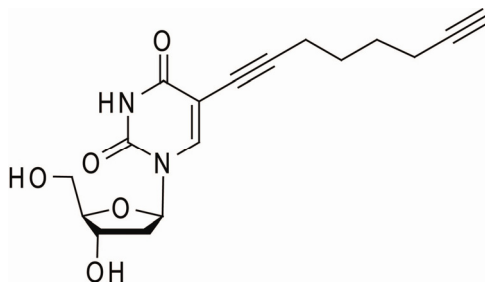
Zu einer Lösung aus 3', 5'-(Bis-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)-5-iod-2'-desoxyuridin (3.00 g, 5.15 mmol), CuI (200 mg, 1.05 mmol, 0.20 eq.), Pd(PPh₃)₄ (600 mg, 0.52 mmol, 0.10 eq.) und *N,N*-Diisopropylethylamin (4.40 mL, 25.7 mmol, 5.00 eq.) in abs. DMF (5 mL) wurde 1-(Trimethylsilyl)-okta-1,7-diin (1.84 g, 10.30 mmol, 2.00 eq.) zugetropft. Es wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt, das Lösungsmittel anschließend *in vacuo* entfernt und der Rückstand in Essigsäureethylester (100 mL) aufgenommen. Es wurde mit ges. NaHCO₃-Lösung (20 mL) gewaschen und dann über Magnesiumsulfat getrocknet. Durch säulenchromatographische Reinigung (Kieselgel-60, *i*-Hexan/EtOAc 4:1) und nachfolgende Umkristallisation (EtOH/H₂O 6:1) wurde das Produkt (1.99 g, 61 %) als farbloser Feststoff erhalten.

$R_f = 0.3$ (*i*-Hexan/EtOAc 4:1).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.96 (s, 1H, HN), 7.91 (s, 1H, HC(6)), 6.29 (dd, 1H, ³*J* = 5.8 Hz, ³*J* = 7.4 Hz, HC(1')), 4.43-4.73 (m, 1H, HC(3')), 3.96-3.90 (m, 1H, HC(4')), 3.75 (dd, 1H, ³*J* = 3.0 Hz, ²*J* = 12.0 Hz, H_αC(5')), 3.71 (dd, 1H, ³*J* = 3.0 Hz, ²*J* = 12.0 Hz, H_βC(5')), 2.38 (t, 2H, ³*J* = 6.5 Hz, H₂C-C≡C,), 2.35-2.26 (m, 1H, H_αC(2')), 2.26 (t, 2H, ³*J* = 6.5 Hz, H₂C-C≡C,), 2.27-2.20 (m, 1H, H_βC(2')), 1.70-1.60 (m, 4H, -H₂C-), 0.94 (s, 9H, *t*Bu-TBDMS), 0.90 (s, 9H, *t*Bu-TBDMS), 0.15-0.06 (m, 21H, H₃C-Si) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 162.0, 149.5, 141.4, 106.8, 100.5, 94.4, 88.2, 85.8, 84.4, 72.3, 71.7, 63.0, 41.8, 27.9, 27.4, 25.8 (3C), 25.5 (3C), 19.5, 19.0, 18.3, 17.8, 0.0 (3C), -4.8, -5.0, -5.5, -5.7 ppm.

MS (ESI⁺): *m/z* berechnet für C₃₂H₅₇N₂O₅Si₃ [M+H]⁺: 633.4; gefunden: 633.4.

5-(Okta-1,7-diänyl)-2'-desoxyuridin (40)

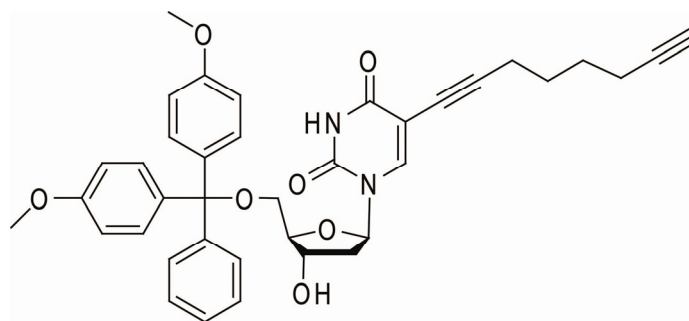
Zu einer gekühlten Lösung (0 °C) von 3',5'-(Bis-*O-tert*-butyldimethylsilyl)-5-(8-trimethylsilyl-okta-1,7-diänyl)-2'-desoxyuridin (1.28 g, 2.02 mmol) in THF (40 mL) wurde TBAF (1 M in THF, 8.08 mL, 4.00 eq.) langsam zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde bei RT über Nacht gerührt, anschließend das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand in Ethylacetat (100 mL) aufgenommen. Es wurde mit Wasser (50 mL) und *Brine* (50 mL) gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat und Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo* wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (Kieselgel-60, Chloroform/Methanol 10:1) aufgereinigt. Man erhielt das Produkt (648 mg, 97 %) als farblosen Feststoff.

$R_f = 0.2$ (Chloroform/Methanol 10:1).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 11.5$ (s, 1H, HN), 8.09 (s, 1H, HC(6)), 6.29 (t, 1H, $^3J = 6.5$ Hz, HC(1')), 5.23 (d, 1H, $^3J = 3.9$ Hz, OH), 5.07 (t, 1H, $^3J = 4.7$ Hz, OH), 4.25-4.15 (m, 1H, HC(3')), 3.80-3.70 (m, 1H, HC(4')), 3.60-3.51 (m, 1H, $H_\alpha\text{C}(5')$), 3.34-3.26 (m, 1H, $H_\beta\text{C}(5')$), 2.41-2.32 (m, 3H, $H_\alpha\text{C}(2')$, $\text{H}_2\text{C-C}\equiv\text{C}$), 2.20-2.00 (m, 4H, $H_\beta\text{C}(2')$, $\text{H}_2\text{C-C}\equiv\text{C}$, $\text{H-C}\equiv\text{C}$), 1.52-1.49 (m, 4H, $-\text{H}_2\text{C}- \times 2$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 162.8, 150.5, 143.6, 99.9, 93.9, 88.5, 85.6, 85.3, 73.9, 72.3, 71.2, 62.0, 40.4, 28.2, 28.0, 19.3, 18.2$ ppm.

MS (ESI $^+$): m/z berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 333.1; gefunden: 333.2.

5-(Okta-1,7-diinyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxyuridin

5-(Okta-1,7-diinyl)-2'-desoxyuridin (1.23 g, 3.70 mmol), Dimethoxytritylchlorid (1.50 g, 4.43 mmol, 1.20 eq.) und DMAP (49.0 mg, 0.40 mmol, 0.1 eq.) wurden in trockenem Pyridin (15 mL) gelöst und bei RT über Nacht gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt, der Rückstand in Ethylacetat (100 mL) aufgenommen und mit Wasser (50 mL) und *Brine* (50 mL) gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat, Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer und säulenchromatographischer Aufreinigung (deaktiviertes Kieselgel-60, Ethylacetat/*i*-Hexan 1:1 → 5:1 + 1% Pyridin) erhielt man das Produkt (1.15 g, 49 %) als farblosen Schaum.

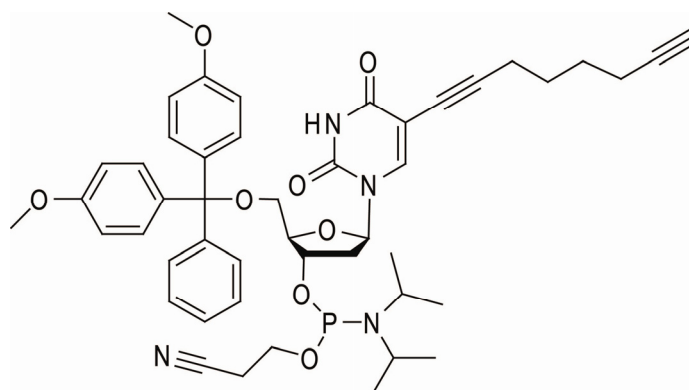
$R_f = 0.2$ (Ethylacetat/*i*-Hexan 1 : 1).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 9.31$ (s, 1H, HN), 8.01 (s, 1H, HC(6)), 7.45-7.14 (m, 9H, $H_{\text{arom-DMT}}$), 6.85 (d, 4H, $^3J = 8.8$ Hz, $H_{\text{arom-DMT}}$), 6.32 (dd, 1H, $^3J = 7.6$ Hz, $^3J = 5.8$ Hz, HC(1')), 4.52-4.49 (m, 1H, HC(3')), 4.09-4.06 (m, 1H, HC(4')), 3.77 (s, 6H, $\text{OCH}_3 \times 2$), 3.40 (dd, 1H, $^3J = 3.2$ Hz, $^2J = 10.8$ Hz, $H_{\alpha}\text{C}(5')$), 3.29 (dd, 1H, $^3J = 3.0$ Hz, $^2J = 10.8$ Hz, $H_{\beta}\text{C}(5')$), 2.46 (ddd, 1H, $^3J = 2.2$ Hz, $^3J = 5.4$ Hz, $^2J = 13.4$ Hz, $H_{\alpha}\text{C}(2')$), 2.25-2.16 (m, 1H, $H_{\beta}\text{C}(2')$), 2.05-1.99 (m, 4H, $\text{H}_2\text{C-C}\equiv\text{C} \times 2$), 1.88 (t, 1H, $^3J = 2.6$ Hz, $\text{H-C}\equiv\text{C}$), 1.42-1.30 (m, 4H, $-\text{H}_2\text{C}- \times 2$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 163.2, 163.0, 153.9, 153.8, 149.1, 146.2, 146.0, 140.4, 140.0, 139.8, 134.4, 134.3, 132.4, 132.2, 131.2$ (2C), 128.2, 128.0, 117.6 (4C), 105.1, 98.5, 91.3, 90.0, 89.6, 88.5, 76.4, 75.7, 72.6, 67.8, 59.6, 45.7, 30.0, 29.5, 21.4, 20.1 ppm.

MS (ESI $^+$): m/z berechnet für $\text{C}_{38}\text{H}_{39}\text{N}_2\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 634.3; gefunden: 634.3.

5-(Okta-1,7-diinyl)-4'-O-(cyanoethyl-*N,N*-diisopropylaminophosphanoxy)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxyuridin (24)



5-(Okta-1,7-diinyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxyuridin (106 mg, 0.17 mmol) und Diisopropylammoniumtetrazolid (30 mg, 0.18 mmol, 1.05 eq.) wurden zweimal mit abs. Pyridin ko-evaporiert und in trockenem Dichlormethan (5 mL) gelöst. 2-Cyanoethyl-*N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphordiamidit (130 μ L, 0.42 mmol, 2.50 eq.) wurde zugegeben und 4 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* auf 1/4 seines Volumens eingengt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (deaktiviertes Kieselgel-60, *i*-Hexan/Ethylacetat 1:1 + 1% Pyridin). Man erhielt das Produkt (91 mg, 64 %) als farblosen Schaum.

R_f = 0.46 (Ethylacetat/*i*-Hexan 1:1).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 11.54 (s, 1H, HN), 7.87 (s, 1H, HC(6)), 7.39-7.36 (m, 2H, $H_{\text{arom-DMT}}$), 7.29-7.17 (m, 7H, $H_{\text{arom-DMT}}$), 6.86-6.83 (m, 4H, $H_{\text{arom-DMT}}$), 6.11-6.05 (m, 1H, HC(1')), 4.51-4.42 (m, 1H, HC(3')), 4.06-3.97 (m, 1H, HC(4')), 3.71 (s, 6H, $\text{OCH}_3 \times 2$), 3.61-3.42 (m, 5H, $\text{H}_2\text{C-O-P}$, $\text{HC-N-P} \times 2$, $H_{\alpha}\text{C}(5')$), 3.26-3.13 (m, 3H, $H_{\beta}\text{C}(5')$, $\text{H}_2\text{C-CN}$), 2.44-2.24 (m, 2H, $H_{\alpha,\beta}\text{C}(2')$), 2.17-2.00 (m, 5H, $\text{H}_2\text{C-C}\equiv\text{C} \times 2$, $\text{H-C}\equiv\text{C}$), 1.40-1.28 (m, 4H, $-\text{H}_2\text{C}- \times 2$), 1.14-1.06 (m, 12H, $\text{CH}_3\text{-CH-N-P} \times 4$) ppm.

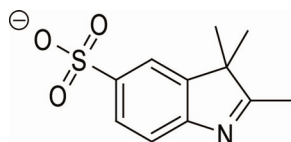
$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 162.1, 158.5, 149.7, 145.0, 142.7, 142.5, 135.8, 135.7, 135.0, 130.1, 130.0, 128.3, 128.0, 127.9 (2C), 127.1, 119.3, 119.1, 113.6 (4C), 99.8 (2C), 93.5, 86.4 (2C), 85.3, 84.6, 72.8, 71.7 (2C), 63.6, 63.4, 58.8, 58.6, 55.4 (2C), 43.1, 42.8, 27.5, 24.6 (2C), 20.2, 20.1, 18.6, 17.6 ppm.

$^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, CDCl_3): δ = 148.6, 148.2 ppm.

HRMS (ESI⁺): m/z berechnet für C₄₇H₅₆N₄O₈P [M+H]⁺: 835.3837; gefunden: 835.3811.

7.1.4 Synthese des Cy3-Azids 27

2,3,3-Trimethylindoleninium-5-sulfonat (29)

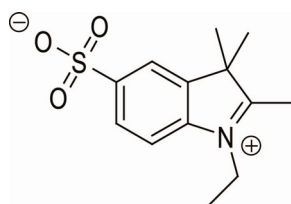


p-Hydrazinobenzolsulfonsäure (50.0 g, 253.8 mmol) und 3-Methyl-2-butanon (84.0 mL, 783.6 mmol, 3.0 eq.) wurden in Essigsäure (100 %, 200 mL) 3 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend ließ man auf RT abkühlen, wobei ein rosa Feststoff ausfiel. Dieser wurde abfiltriert, in Methanol (1000 mL) aufgenommen und mit einer ges. KOH/*i*-Propanol-Lsg. (500 mL) in sein Kaliumsalz überführt. Das Produkt fiel als gelber Feststoff aus, wurde abfiltriert und mit Methanol (400 mL) gewaschen. Nach Trocknung am HV erhielt man **29** als Kaliumsalz (52.0 g, 74 %).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.62 (d, 1H, ⁴*J* = 1.8 Hz, *H*_{arom}C), 7.55 (dd, 1H, ³*J* = 7.8 Hz, ⁴*J* = 1.8 Hz, *H*_{arom}C), 7.33 (d, 1H, ³*J* = 7.8 Hz, *H*_{arom}C), 2.21 (s, 3H, *H*₃C), 1.25 (s, 6H, (*H*₃C)₂C) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 189.2, 172.5, 145.5, 145.4, 125.5, 119.5, 118.5, 53.6, 22.9 (2C), 15.5 ppm.

MS (ESI⁻): m/z berechnet für C₁₁H₁₂NO₃S [M]⁻: 238.1; gefunden: 238.1.

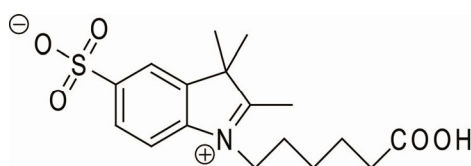
1-Ethyl-2,3,3-trimethylindoleninium-5-sulfonat (30)

29 (11.0 g, 39.7 mmol) wurde in einem großen Überschuss Ethyliodid (50 mL) 24 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend ließ man auf RT abkühlen, filtrierte den rosa Feststoff ab und trocknete ihn ohne weitere Aufarbeitung am HV. Man erhielt **30** (10.6 g, 73 %) als quartäres Salz.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 8.02 (d, 1H, 4J = 1.6 Hz, H_{aromC}), 7.93 (dd, 1H, 3J = 8.4 Hz, 4J = 1.6 Hz, H_{aromC}), 7.80 (d, 1H, 3J = 8.4 Hz, H_{aromC}), 4.25 (q, 2H, 3J = 7.6 Hz, $-H_2C-$), 1.97 (s, 3H, H_3C), 1.49 (s, 6H, $(H_3C)_2C$), 1.43 (t, 3H, 3J = 7.6 Hz, H_3C) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): δ = 219.7, 156.2, 144.1, 142.7, 126.9, 120.9, 115.7, 54.8, 43.7, 21.4 (2C), 12.1, 9.8 ppm.

MS (ESI⁺): m/z berechnet für C₁₃H₁₇NO₃SNa [M+Na]⁺: 291.1; gefunden: 291.1.

1-(ϵ -Carboxypentanyl)-2,3,3-trimethylindoleninium-5-sulfonat (32)

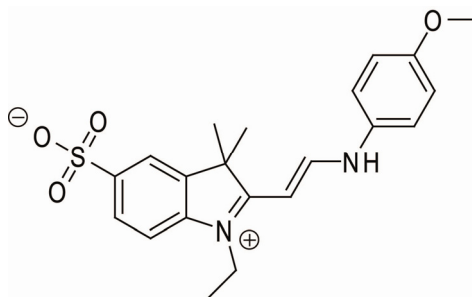
29 (11.0 g, 39.7 mmol) und 6-Bromhexansäure (9.8 g, 50.2 mmol, 1.25 eq.) wurden in 1,2-Dichlorbenzol (100 mL) 18 h unter Argon auf 110 °C erhitzt. Dabei bildete sich ein roter Feststoff. Man ließ das Reaktionsgemisch auf RT abkühlen, dekantierte das Lösungsmittel ab, löste erneut in Methanol und entfernte das Lösungsmittel *in vacuo*. Man erhielt **32** (11.6 g, 56 %) als roten Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ = 8.02 (s, 1H, H_{aromC}), 7.92 (d, 1H, 3J = 8.4 Hz, H_{aromC}), 7.79 (d, 1H, 3J = 8.4 Hz, H_{aromC}), 4.42 (t, 2H, 3J = 8.0 Hz, $-\text{H}_2\text{C}_\alpha-$), 2.28-2.26 (m, 2H, $-\text{H}_2\text{C}_\epsilon-$), 1.90-1.82 (m, 2H, $-\text{H}_2\text{C}_\beta-$), 1.61-1.29 (m, 4H, $-\text{H}_2\text{C}_{\gamma,\delta-}$), 1.49 (s, 6H, $(\text{H}_3\text{C})_2\text{C}$), 1.43 (s, 3H, H_3C) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O): δ = 199.1, 178.6, 144.2, 142.6, 130.5, 126.9, 120.9, 115.9, 54.9, 52.9, 33.4, 26.8, 25.2, 23.7, 21.5 (2C), 9.5 ppm.

MS (ESI): m/z berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{NO}_5\text{S}$ $[\text{M-H}]^-$: 352.1; gefunden: 352.2.

1-Ethyl-2-[2-(4-methoxyphenylamino)vinyl]-3,3-dimethyl-indoleninium-5-sulfonat (**31**)

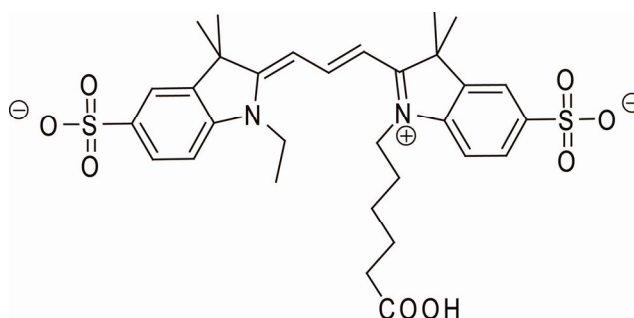


30 (4.94 g, 11.41 mmol) wurde mit N,N' -Bis(4-methoxyphenyl)formamidin (2.93 g, 11.41 mmol, 1.00 eq.) und Triethylorthoformiat (1.88 mL, 11.41 mmol, 1.00 eq.) in 1-Butanol (30 mL) gelöst und 5.5 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt, der Rückstand in Methanol gelöst und schnell über eine kurze Kieselgelsäule laufen gelassen. Das Rohprodukt wurde mit Ethylacetat gewaschen und am HV getrocknet. Man erhielt **31** (4.80 g, 74%) in Form eines orange-roten Feststoffs.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ = 8.35 (s, 1H, HN), 8.09 (s, 1H, H_{aromC}), 7.75-7.73 (m, 2H, H_{aromC}), 7.67 (d, 2H, 3J = 8.0 Hz, H_{aromC}), 7.44 (d, 2H, 3J = 8.0 Hz, H_{aromC}), 7.29 (d, 1H, 3J = 9.2 Hz, HC_{vinyl}), 6.88 (d, 1H, 3J = 9.2 Hz, HC_{vinyl}), 3.70 (s, 3H, H_3CO), 3.45 (q, 2H, 3J = 7.2 Hz, $-\text{H}_2\text{C}-$), 1.23 (s, 6H, $(\text{H}_3\text{C})_2\text{C}$), 1.06 (t, 3H, 3J = 7.2 Hz, H_3C) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O): δ = 195.4, 162.6, 154.2, 146.5, 139.8, 125.6 (2C), 123.7, 121.6, 119.4, 118.9 (2C), 115.2, 114.5, 101.1, 65.9, 54.3, 23.1, 21.8 (2C), 14.1 ppm.

MS (ESI⁺): m/z berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M+H}]^+$: 401.1; gefunden: 401.1.

Cy3-COOH (33)

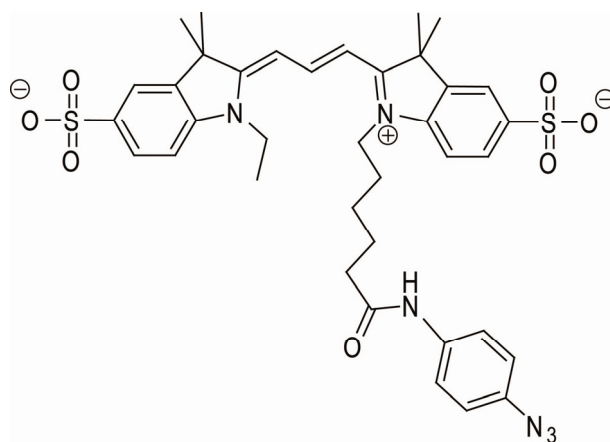
31 (530 mg, 1.32 mmol) wurde in einer Mischung aus Essigsäureanhydrid (5 mL) und Pyridin (5 mL) gelöst und **32** (540 mg, 1.52 mmol, 1.15 eq.) zugegeben. Die Mischung wurde für 5 h auf 110 °C erhitzt und bei RT über Nacht gerührt. Der Cy3-Farbstoff wurde mit abs. Diethylether ausgefällt, abfiltriert und durch RP-HPLC mit einem 0.1 M HNEt₃/OAc Puffersystem (Puffer A: H₂O; Puffer B: MeCN/H₂O 4:1; Gradient: 0-40% B in 45min; t_R = 28 min) gesäubert. Man erhielt **33** (251 mg, 23%) in Form seines Bis-Triethylammoniumsalzes als dunkelroten Feststoff.

UV (H₂O): λ_{max} = 545 nm.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 8.54 (t, 1H, ³J = 13.7 Hz, HC_β-vinyl), 7.74-7.63 (m, 4H, H_{arom}C), 7.26-7.18 (m, 2H, H_{arom}C), 6.25-6.13 (m, 2H, HC_{α,α'}-vinyl), 4.00-3.90 (m, 4H, -H₂C_{α,α'}-), 3.14 (q, 14 H, ³J = 7.4 Hz, -H₂C-COOH, 2 × 3-H₂C- (TEA)), 2.22-2.08 (m, 2H, -H₂C-), 1.59 (s, 12H, 2 × (H₃C)₂C), 1.46-1.42 (m, 2H, -H₂C-), 1.31-1.23 (m, 2H, -H₂C-), 1.21 (t, 21 H, ³J = 7.4 Hz, H₃C, 2 × 3 H₃C (TEA)) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): δ = 197.4, 178.8, 172.3, 140.4, 136.8, 129.6, 119.9, 119.2, 116.4, 115.1, 114.2, 108.7, 103.5, 96.7, 65.9, 47.9, 46.0, 43.8, 42.6, 34.9, 30.7, 27.6, 26.0, 25.5, 24.5, 14.0 ppm.

HRMS (ESI): m/z berechnet für C₃₁H₃₇N₂O₈S₂ [M]⁻: 629.1997; gefunden: 629.2002.

Cy3-N₃ (27)

33 (325 mg, 0.52 mmol), 4-Azidoanilinhydrochlorid (352 mg, 2.06 mmol, 3.96 eq.) und HATU (785 mg, 2.06 mmol, 3.96 eq.) wurden in abs. DMF (10 mL) und DIEA (0.5 mL) gelöst und bei RT über Nacht gerührt. Das Rohprodukt wurde mit abs. EtOAc (50 mL) ausgefällt und durch RP-HPLC gesäubert. Die Trennung wurde mit einem 0.1 M HNEt₃/OAc Puffersystem (Puffer A: H₂O, Puffer B: MeCN/H₂O 4:1) durchgeführt. Die Flussrate betrug 5 mL/min und es wurde ein linearer Gradient von 100% A auf 60% A in 45 min gefahren. **27** (290 mg, 0.31 mmol, 60%) wurde bei 45 min als Bis-Triethylammoniumsalz eluiert.

UV (H₂O): λ_{max} = 545 nm.

¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ = 8.08 (t, 1H, 3J = 13.8 Hz, HC _{β} -vinyl), 7.73-7.66 (m, 4H, H_{arom}C), 7.16-7.04 (m, 4H, H_{arom}C), 6.47-6.42 (m, 2H, H_{arom}C), 6.14 (d, 1H, 3J = 13.8 Hz, HC _{α'} -vinyl), 6.08 (d, 1H, 3J = 13.8 Hz, HC _{α'} -vinyl), 3.90-3.75 (m, 4H, -H₂C _{α,α'} -), 3.06 (q, 14 H, 3J = 7.2 Hz, -H₂C-CONHAr, 2 × 3-H₂C- (TEA)), 2.08-2.00 (m, 2H, -H₂C-), 1.55-1.50 (m, 2H, -H₂C-), 1.33 (s, 12H, 2 × (H₃C)₂C), 1.14 (t, 21H, 3J = 7.2 Hz, H₃C, 2 × 3 H₃C (TEA)), 1.03-1.00 (m, 2H, -H₂C-), ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 181.6, 175.7, 175.0, 151.5, 143.9, 143.4, 141.4, 141.3, 140.3, 134.9, 126.9, 121.6, 120.0, 119.1, 118.7, 111.6, 111.2, 105.0, 103.6, 103.2, 59.1, 49.2, 44.2, 42.4, 39.6, 36.3, 27.2, 27.1, 26.7, 25.5, 24.9, 11.7 ppm.

HRMS (ESI): m/z berechnet für C₃₇H₄₁N₆O₇S₂ [M]⁻: 745.2484; gefunden: 745.2496.

7.1.5 Synthese des Arg₈-Azids 36

Fmoc-Arg₈-COOH (37)

Die Festphasensynthese wurde in einer 5 mL Spritze mit eingesetzter Fritte durchgeführt. Eine Synthese bestand aus den folgenden Schritten:

1. Quellen des Harzes

Das Fmoc-D-Arg(Pmc)-Wang-Harz (100 mg, 0.07 mmol) wurde 30 min in abs. DCM (1 mL) suspendiert und mind. weitere 30 min quellen gelassen. Anschließend wurde das Harz gewaschen.

2. Waschen

Ein Waschgang bestand aus viermaliger Zugabe von NMP (*peptide grade*) und zweimaliger Zugabe von abs. DCM (2 × NMP, 2 × DCM, 2 × NMP). Dabei wurde jeweils mind. das dreifache Harzvolumen an Lösungsmittel eingesetzt, eine Minute lang geschüttelt und dann das Lösungsmittel abgedrückt.

3. Entschützen

Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte durch zweimalige Anwendung von 20 % Piperidin in NMP (dreifaches Harzvolumen, 2 × 15 min).

→ Waschgang

4. Aktivierung und Kupplung der Aminosäure

Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH (126 mg, 0.19 mmol, 2.71 eq.) wurde mit einem geringen Überschuss HATU (80 mg, 0.21 mmol, 2.98 eq.) in NMP (3 mL) und DIEA (0.5 mL) versetzt. Die Lösung wurde auf das entschützte Harz gegeben und 90 min am KPG-Rührer rotiert.

→ Waschgang

Die Schritte 3. und 4. wurden je sechsmal wiederholt und das Harz nach dem letzten Waschgang weitere sechsmal mit DCM (jeweils dreifaches Harzvolumen) gewaschen.

5. Abspaltung und Reinigung

Das Harz wurde mit einer Mischung aus TFA / TIPS / H₂O = 95.0 % / 2.5 % / 2.5 % (2 mL) mind. 2 h versetzt, was zur Abspaltung der Schutzgruppen (nicht Fmoc) und der Abspaltung des Peptids von der festen Phase führte. Das Harz wurde nochmals mit TFA (2 mL) gewaschen, die vereinigten Spalllösungen vereinigt und TFA mit N₂

abgeblasen. Das Rohprodukt wurde in 3 mL Wasser aufgenommen und durch RP-HPLC mit einem 0.1 M Ammoniumacetat Puffersystem (Puffer A: H₂O; Puffer B: MeCN/H₂O 4:1 Gradient: 0-40 % B in 45 min; t_R = 26 min) gesäubert. Nach Entsalzen mit *SepPak*TM C₁₈-Säulen erhielt man Fmoc-Arg₈-COOH (24 mg, 25 %) als farblosen Feststoff.

MS (MALDI-TOF⁺): m/z berechnet für C₆₃H₁₀₉N₃₂O₁₁ [M+H]⁺: 1489.9; gefunden: 1490.7.

Fmoc-Arg₈-N₃ (36)

Fmoc-Arg₈-COOH (19.0 mg, 12.8 µmol), *p*-Azidoanilin (17.5 mg, 102.4 µmol, 8.0 eq.) und HATU (9.7 mg, 25.6 µmol, 2.0 eq.) wurden in abs. DMSO (0.5 mL) unter Zusatz von DIEA (50 µL) gelöst und 3 h bei RT gerührt. Anschließend wurde mit der dreifachen Menge Wasser verdünnt und komplett lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde in 1 mL Wasser aufgenommen und durch RP-HPLC mit einem 0.1 M Ammoniumacetat Puffersystem (Puffer A: H₂O; Puffer B: MeCN/H₂O 4:1 Gradient: 0-40 % B in 90 min; t_R = 67 min) gereinigt. Nach Entsalzen mit *SepPak*TM C₁₈-Säulen erhielt man Fmoc-Arg₈-N₃ (3.2 mg, 16 %) als farblosen Feststoff.

MS (MALDI-TOF⁺): m/z berechnet für C₆₉H₁₁₂N₃₆O₁₀ [M]⁺: 1604.9; gefunden: 1604.4.

7.1.6 Click-Chemie

Click in Lösung

DNA (0.38 mM, 200 µL, 76 nmol in Wasser) und Azid (10 mM, 114 µL, 1140 nmol, 15 eq. in Wasser oder DMSO/*t*BuOH 3:1) wurden in einem 1.5 mL Eppendorf Gefäß gemischt. In einem separaten Gefäß wurden 17 µL CuBr (0.1 M in DMSO/ *t*BuOH 3:1) und 34 µL TBTA-Ligand (0.1 M in DMSO/ *t*BuOH 3:1) gemischt und zu der DNA-Azid Mischung gegeben. Die Lösung wurde bei RT für 4 h geschüttelt und anschließend mit einer 0.3 M NaOAc-Lösung versetzt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1 mL kaltem EtOH (-20 °C) gefällt. Nach Zentrifugation (20 min, 13000 rpm) wurde der Überstand vorsichtig abgegossen und das Pellet nochmals mit kaltem

EtOH (-20 °C) sowie Diethylether gewaschen. Das Pellet wurde an Luft getrocknet und in Wasser aufgenommen.

Entschützung der TIPS-Gruppe

Nach der ersten Click-Reaktion wurde die lyophilisierte DNA in 100 µL TBAF-Lösung (1.0 M in THF) aufgenommen und für 1 h bei 25 °C geschüttelt. Im Anschluss wurde 100 µL Tris-HCl (1 M, pH 7.5) zugegeben und die Lösung an einer *SpeedVac* eingengt. Die Fällung der DNA erfolgte wie vorher beschrieben.

Click an Partikel

Die Alkin-modifizierte doppelsträngige DNA (0.70 mM, 71 µL, 50.0 nmol in Wasser) wurde zu den Partikeln ($c(\text{Azid}) = 166 \text{ nmol/mg}$, 0.25 mg, 250 µL, 41.5 nmol in Wasser) gegeben. In einem separaten Gefäß wurden 1 µL CuBr (0.1 M in DMSO/*t*BuOH 3:1) und 2 µL TBTA-Ligand (0.1 M in DMSO/*t*BuOH 3:1) gemischt und zu der DNA-Azid Mischung gegeben. Die Lösung wurde bei RT über Nacht geschüttelt und die Partikel im Anschluss mit Wasser gewaschen.

7.2 Biochemische Methoden

7.2.1 Material und Methoden

Allgemeines: Alle nachfolgend beschriebenen Schritte wurden ausschließlich unter Verwendung autoklavierter Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße ausgeführt, zudem wurden Nitril- oder Latexhandschuhe getragen, um eine Kontamination der Proben durch körpereigene Proteine zu verhindern. Die Aufbewahrung aller Substanzen erfolgte bei -20 °C. Zwischen allen Pipetier- und Inkubationsschritten wurden die Proben kurz gevortext und zentrifugiert.

Biochemikalien: Enzyme mit den entsprechenden Reaktionspuffern, BSA und λ DNA wurden von *New England Biolabs*, *Sigma-Aldrich* und *Roche* bezogen. Acrylamidstocklösungen für die Gelanalytik (Rotiphorese Sequenziergelkonzentrat und Rotiphorese 30) stammten von *Roth*, TEMED für die Gelpolymerisation von *Fluka*.

Konzentrationsbestimmungen von Proteinen wurden per *Bradford* Protein Assay ermittelt. Hierbei wird ausgenutzt, dass sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs *Coomassie Brilliant Blue R250* durch Interaktion mit den basischen Aminosäureseitenketten von Arginin und Lysin von 465 nm nach 595 nm verschiebt. Es wurden jeweils 200 µL der *Bradford*-Stammlösung (*Bio-Rad*) mit 800 µL bidestilliertem Wasser versetzt. Hierzu wurden 0.5–10 µL der zu bestimmenden Proteinlösung gegeben. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Durch Vergleich mit einer anhand von BSA-Standardlösungen bekannter Konzentrationen ermittelten Kalibriergeraden ließ sich dann die gesuchte Proteinkonzentration ablesen.

Gelanalytik: DNA-Proben wurden auf denaturierenden oder nativen Polyacrylamidgelen (PAAG), DNA-Protein-Komplexe auf SDS-Gelen in einer Mini-PROTEAN 3-Kammer von *Bio-Rad* analysiert (die Abmessungen der Gele betrugen 83 mm (w) x 82 mm (h) x 0,75 mm (d)). Proben auf denaturierenden/nativen PAA Gelen wurden zunächst mit 50 % PAA Auftragspuffer gemischt und in 1x TBE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt (12 mA für 45–60 min). Proben auf SDS-Gelen wurden zunächst mit 50 % SDS-Auftragspuffer gemischt und in 1x Tris/Glycin/SDS- Puffer (*Bio-Rad*) bei 12 mA für 45–90 min elektrophoretisch aufgetrennt. Nicht fluoreszenzmarkierte DNA wurde zunächst mit SYBR Green II bzw. SYBR Gold (*Invitrogen*) behandelt (20 min Inkubation der Gele bei RT in einer 1:10.000 Lösung von SYBR Reagenz in 1 x TBE-Puffer) und anschließend mit einem LAS3000 *Imaging* System (*Fujifilm/RayTest*) detektiert. Fluoreszenzmarkierte DNA konnte direkt mit dem *Imaging* System detektiert werden. Abhängig vom Fluoreszenzfarbstoff wurden entsprechende *Cutoff* Filter verwendet (515 nm für SYBR Green II/SYBR Gold und Fluorescein, 605 nm für Cy3). Proteine wurden per *Coomassie Blue* Färbung detektiert.

Zusammensetzung der Gele:*Denaturierende PAA-Gele (Angaben je für 2 Gele).*

Acrylamid-konz.	Rotiphorese Seq.gelkonz. [mL]	Gel-verdünner [mL]	10 x TBE-Puffer [mL]	APS-Lösung [µL]	TEMED [µL]
3.75 %	1.5	7.5	1	40	5
6 %	3.6	9.9	1.5	60	8
8 %	3.2	5.8	1	40	5
12 %	4.8	4.2	1	40	5
16 %	6.4	2.6	1	40	5
20 %	8	1	1	40	5

Bei 12, 16 und 20 % Trenngelen wurden 8 % Sammelgele, bei 6 % Trenngelen wurden 3.75 % Sammelgele verwendet.

Native PAA-Gele (Angaben für 2 Gele).

Acrylamid-konz.	Rotiphorese 30 [mL]	Wasser [mL]	10 x TBE-Puffer [mL]	APS-Lösung [µL]	TEMED [µL]
3.75 %	1.5	7.5	1	40	5
6 %	3.6	9.9	1.5	60	8
8 %	3.2	5.8	1	80	4
20 %	8	1	1	80	4
22.5 %	9	0	1	80	4

Bei 22.5 % und 20 % Trenngelen wurden 8 % Sammelgele, bei nativen 6 % PAA Gelen wurden 3.75 % Sammelgele verwendet.

SDS-Protein-Gele (Angaben je für 2 Gele): Sammelgele

Acrylamid-konz.	Rotiphorese 30 [mL]	Wasser [mL]	Tris (0.5M, pH 6.8) [mL]	SDS-Lsg. (10 %) [µL]	APS-Lsg. (10 %) [µL]	TEMED [µL]
3.75 %	0.5	2.45	1	40	40	4

SDS-Protein-Gele (Angaben je für 2 Gele): Trenngele

Acrylamid-konz.	Rotiphoese 30 [mL]	Wasser [mL]	Tris (1.5 M, pH 8.8) [mL]	SDS-Lsg. (10 %) [μL]	APS-Lsg. (10 %) [μL]	TEMED [μL]
6 %	2.0	5.3	2.5	100	100	10
12.5 %	3.8	5	3	120	50	5

Zusammensetzung der Puffer:

10 x TBE-Puffer: 0.89 M Tris, 0.89 M Borsäure, 32 mM EDTA.

2 x PAA-Auftragspuffer: 50 % (v/v) Glycerin, 0.2 % (w/v) SDS, 0.05 % (w/v) Bromphenolblau, 0.05 (w/v) % Xylencyanol.

2 x SDS-Auftragspuffer: 62.5 mM Tris, 4 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin, 5 % (w/v) β -Mercaptoethanol, pH 6.8.

10 x SDS-Laufpuffer: 0.25 M Tris, 1.29 M Glycin, 1 % (w/v) SDS.

APS-Lösung: 10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat.

Gelverdünner: 7.0 M Harnstofflösung (500 g/L).

SDS-Lösung: 10 % (w/v) Natriumdodecylsulfat.

SDS-Trenngelpuffer: 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8.

SDS-Sammelgelpuffer: 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8.

Coomassie-Färbelösung: 0.25 % (v/v) *Coomassie Brilliant Blue* R250, 9.2 % (v/v) Essigsäure, 45.5 % (v/v) Ethanol.

Coomassie-Entfärbelösung: 12 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure.

NEBuffer 1 (New England Biolabs): 10 mM Bis-Tris-Propan-HCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM Dithiothreitol, pH 7.0.

NEBuffer 2 (New England Biolabs): 10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM Dithiothreitol, pH 7.9.

NEBuffer 3 (New England Biolabs): 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl 10 mM MgCl_2 , 1 mM Dithiothreitol, pH 7.9.

NEBuffer 4 (New England Biolabs): 50 mM KOAc, 20 mM Tris-OAc 10 mM MgOAc_2 , 1 mM Dithiothreitol, pH 7.5.

DNAse I Reaktionspuffer (New England Biolabs): 10 mM Tris-HCl, 2.5 mM MgCl_2 , 0.5 mM CaCl_2 , pH 7.6.

M.HhaI Reaktionspuffer (New England Biolabs): 50 mM Tris-HCl, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 10 mM EDTA, pH 7.5.

DNMT1 Reaktionspuffer (New England Biolabs): 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol, 5% Glycerin, pH 7.8.

7.2.2 Stabilitätstests

1. Zelllysatassay: DNA (40 pmol) wurde mit einem Zelllysat (46 µg) aus einem HCT116-Zellstamm (Proteinkonzentration = 23 mg/mL) für 0, 4 und 20 h in 1x NEBuffer 1 bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde per denaturierender PAGE (20 %, 12 mA) analysiert.
2. Exonukleaseassay: DNA (22 pmol) wurde mit 20 U Exonuklease III in 1x NEBuffer 1 für 4 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde per denaturierender PAGE (20 %, 12 mA) analysiert.
3. Endonukleaseassay: DNA (22 pmol) wurde mit 2 U DNase I in 1x DNase I Reaktionspuffer für 4 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde per denaturierender PAGE (20 %, 12 mA) analysiert.

7.2.3 EMSA Studien (*Electrophoretic Mobility Shift Assays*)

1. Versuche mit bakteriellen Methyltransferasen:

M.HhaI: 3.2 pmol DNA wurden mit 50 U Protein (13.4 pmol) und 80 µM SAM in M.HhaI Reaktionspuffer für 2 h bei 37 °C in einem Gesamtvolumen von 10 µL inkubiert. Die Reaktion wurde für 5 min auf 95 °C erhitzt und anschließend per SDS-PAGE (12 %, 12 mA) analysiert.

M.SssI: 3.2 pmol DNA wurden mit 12 U Protein (12.9 pmol) und 160 µM SAM in NEBuffer 2 für 2 h bei 37 °C in einem Gesamtvolumen von 10 µL inkubiert. Die Reaktion wurde für 5 min auf 95 °C erhitzt und anschließend per SDS-PAGE (12 %, 12 mA) analysiert.

2. Versuche mit DNMT1:

4.0 pmol DNA wurden mit 10 U Protein (7.3 pmol) und 160 µM SAM in DNMT1 Reaktionspuffer für 2 h bei 37 °C in einem Gesamtvolumen von 10 µL inkubiert. Die Reaktion wurde für 5 min auf 95 °C erhitzt und anschließend per SDS-PAGE (6 %, 12 mA) analysiert.

7.2.4 *In vitro* Aktivitätsassays

1. Versuche mit bakteriellen Methyltransferasen:

4, 8 bzw. 16 pmol DNA (aktive Stränge) bzw. 16 pmol (Kontrollen) wurden mit 25 U (6.7 pmol) M.HhaI (8 U [8.6 pmol] M.SssI) und 80 μ M (160 μ M) SAM in M.HhaI Reaktionspuffer (NEBuffer 2) in einem Reaktionsvolumen von 10 μ L für 75 min bei 37 °C inkubiert. λ DNA (0.5 μ g) wurde zugefügt, die Inkubation 4 h fortgesetzt und anschließend durch Erhitzen auf 65 °C über einen Zeitraum von 15 Minuten gestoppt. 40 μ L *HhaI Mix* (10 μ L *BstUI Mix*) wurden zugegeben (*HhaI Mix*: 10 U HhaI, 100 μ g/mL BSA, 1 mM MgCl₂, 1 x NEBuffer 4; *BstUI Mix*: 10 U BstUI, 1 x NEBuffer 2) und die Reaktion bei 37 °C für 30 min (60 °C für 1 h) fortgeführt. Die Analyse der Reaktionen erfolgte durch denaturierende PAGE (6 %, 12 mA).

2. Versuche mit DNMT1:

7.2 pmol Inhibitor DNA wurden mit 12 U (8.8 pmol; nur teilweise aktiv) DNMT1, 1.6 mM SAM und 100 μ g/mL BSA in DNMT1 Reaktionspuffer in einem Volumen von 25 μ L bei 37 °C für 100 min inkubiert. Die folgende Beschreibung folgt größtenteils einer kürzlich veröffentlichten Methode.^[437] 10 pmol DNA **DS30** und 0.5 μ L SAM (32 mM) wurden zur obigen Reaktionsmischung gegeben, die Reaktion für 5 h bei 37 °C fortgesetzt und durch Erhitzen auf 60 °C für 20 min gestoppt. Ein großer Überschuss an unmethyliertem Einzelstrang (**S10**, 2.5 nmol) wurde zugegeben und die DNA durch Erhitzen auf 95 °C für 5 min und Abkühlen auf Raumtemperatur (mind. 45 min) rehybridisiert. Die Reaktionsmischung wurde anschließend mit BioSpin 6 Gelfiltrationssäulen behandelt (10 mM Tris, pH 7.4, *Bio-Rad*) und mit 20 U HpaII und 5.8 μ L NEBuffer 1 versetzt. Nach Inkubation bei 37 °C für 2 h und anschließendem Entsalzen für 30 min auf Membranfiltern (Porengröße 0.025 μ m, *Millipore*) wurde die Reaktionslösung komplett lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 10 μ L Wasser aufgenommen und per denaturierendem PAGE (20 %, 12 mA) analysiert.

7.2.5 Zellkultur; Transfektion von DNA

HCT116-Zellen (humane Darmkrebszellen) wurden in Gibco® DMEM + GlutaMAX-I Medium ((-) Pyruvat, (+) 4.5 g/L Glucose, *Invitrogen*) mit 10 % FKS (*Invitrogen*,

hitzeinaktiviert: 10 min / 56 °C) in T25 Zellkulturflaschen (25 cm², für 5 mL Medium, *Greiner bio-one*) bzw. LabTek Kammerdeckgläsern (für 3 mL Medium, *Nunc*) bei 37 °C / 5 % CO₂ kultiviert. Bei einer Konfluenz von 80 % bis maximal 90 % wurden die Zellen passagiert. Für T25 Flaschen: Medium abnehmen, Zellen mit 3 mL PBS Puffer (*Invitrogen*) waschen, 3 min bei 37 °C mit 1 mL Trypsin (*Invitrogen*) inkubieren, mit 10 mL Medium abstoppen, zentrifugieren (10min/1000xg). Split in der Regel 1:15. Zur Transfektion von DNA wurden 5x10⁵ Zellen pro T25 Flasche eingesät (LabTek Kammerdeckgläser: 1x10⁵ Zellen) und eine Nacht (LabTek Kammerdeckgläser: 2 Nächte) anwachsen gelassen. Bei einem finalen Volumen von 5 mL Medium (T25 Flaschen; LabTek: 3 mL) wurde 1 µM DNA (LabTek: 0.6 µM) in 500 µL Medium (ohne FKS) durch Umschütteln (nicht vortexen!) mit 10 µL Transfectin Reagenz (*Bio-Rad*) in 500 µL Medium (ohne FKS) gemischt, 30 min bei RT inkubiert und dann zu den Zellen in 4 mL Medium (mit FKS) gegeben. Die finale DNA Konzentration entsprach somit 100 nM. Nach Inkubation über Nacht wurde das Medium gewechselt. Die Aufnahme der DNA in die Zellen/Zellkerne wurde mit Hilfe von konfokaler *Laser-Scanning* Mikroskopie (KLSM) überprüft. Für hochwertige KLSM Aufnahmen wurde die Transfektion in LabTek-Kammerdeckgläsern durchgeführt.

7.2.6 Inkubation von HCT116-Zellen mit Nukleosiden

1 x 10⁵ Zellen wurden in T25 Zellkulturflaschen in 5 mL DMEM Medium eingesät und über Nacht anwachsen gelassen (Tag 1). In der Regel wurden die Zellen dann an den Tagen 2, 3, 5 und 6 mit Nukleosiden verschiedener Konzentration (dC^N **5**: 1 µM; carbdC^N **15**: 20, 300 und 1000 µM) inkubiert. An Tag 4 mussten die Zellen umgesetzt werden (Split 1:5). Die Zelllyse und DNA-Extraktion erfolgte an Tag 7 (s. u.). Als Negativkontrolle dienten Zellen, die lediglich mit Medium (ohne Nukleosid) inkubiert wurden. Zur Herstellung der Stocklösungen der Nukleoside (carbdC^N: 25 mM; und dC^N: 1 mM) wurden diese in Medium (ohne FKS) aufgenommen und steril filtriert.

7.2.7 DNA Extraktion aus humanen HCT116-Krebszellen

Genomische DNA wurde mit Hilfe des QIAamp DNA-Mini Kits von *Qiagen* extrahiert. Die Zellen wurden zunächst bei 70 – 80 % Konfluenz abtrypsiniert (s.o.) und, im Falle von T25 Zellkulturflaschen, in 400 µL PBS-Puffer resuspendiert. Dann wurden 40 µL Proteinase K (*Qiagen*), 8 µL RNase A (100 µg/µL, 100 U/mg, in 50 % Glycerin, 10 mM Tris-HCl, pH 8, *Fluka Biochemika*) und 400 µL AL-Puffer zugegeben; zwischen den einzelnen Schritten wurden die Proben gevortext. Die weitere Behandlung erfolgte gemäß *Qiagen* Protokoll.^[32] Schließlich folgte die Elution mit 2 x 200 µL AE Puffer. Anschließend wurden die Proben über Nacht bei RT mit 4 µL *RNase, DNase free* (0.5 µg/µL, *Roche*) inkubiert. Nach Zugabe von 600 µL NH₄OAc (0.3 M) wurde die DNA mit 9 mL EtOH ausgefällt und die Proben über Nacht bei -20 °C gelagert. Die DNA wurde abzentrifugiert (10 min/13.000 min⁻¹), EtOH abdekantiert, EtOH Reste mit N₂ abgeblasen, die DNA in 70 µL AE Puffer (*Qiagen*) aufgenommen und mit Biospin 6 Gelelutionssäulen (10 mM Tris, pH 7.4, *Bio-Rad*) weiter aufgereinigt. Pro T25 Zellkulturflasche konnten in der Regel 30–40 µg reine genomische DNA isoliert werden.

7.2.8 Enzymatischer DNA-Totalverdau; Bestimmung des globalen dC^M-Gehalts

Der Verdau genomischer DNA wurde, mit einigen Modifikationen, wie in der Literatur beschrieben durchgeführt.^[438, 439] Hierzu wurde eine wässrige Lösung von 3.5 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 30 µL für 5 min auf 95 °C erhitzt und die Probe sofort auf Eis gekühlt (Kühlung für insg. 5 min). Dieser Schritt war notwendig, da die als erstes verwendete Nuklease P1 bevorzugt einzelsträngige DNA abbaut. 4.4 µL NH₄OAc (0.1 M) und 10.0 µL Nuklease P1 (0.2 U / µL in 10 mM NH₄OAc, *Sigma*) wurden zugegeben und die Reaktion für 2 h bei 45 °C inkubiert. Dann wurden 5.0 µL NH₄HCO₃ (1 M) und 1 µL *Snake Venom* Phosphodiesterase I (0.002 U / µL in 100 mM Tris-HCl, pH 8.9 100 mM NaCl, 14 mM MgCl₂, *Sigma*) zugegeben und die Reaktion für 2.5 h bei 37 °C fortgesetzt. Nach Zugabe von 1 µL *Antarctic* Phosphatase (5 U / µL, *New England Biolabs*) zusammen mit 5.6 µL des entsprechenden Reaktionspuffers wurde eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert und die Reaktion durch Erhitzen auf 95 °C (5 min) gestoppt. Ausgefallenes Protein wurde

abzentrifugiert (13.000 min^{-1} / 10 min) und die komplette Reaktionsmischung per *Reversed Phase* HPLC analysiert. Hierzu wurde ein *Waters Alliance* Gerät mit einer Nucleosil C-18 Säule bei einem Fluss von 0.5 ml/min benutzt. Als Puffer wurden 0.1 M HNEt_3OAc in Wasser (Puffer A) und 0.1 M HNEt_3OAc in 20 % Wasser/80 % Acetonitril (Puffer B) mit einem linearen Gradienten von 0 bis 20 % Puffer B in 30 min verwendet. Die Chromatogramme wurden mit einem *Photodiodearray* Detektor aufgenommen und die Integrale bei 278 nm bestimmt (bei dieser Wellenlänge haben dC und dC^M den gleichen Extinktionskoeffizienten). Der 5-Methyl-dC-Gehalt wird als Verhältnis von dC^M zur Gesamtmenge an Cytidin angegeben:

5-Methyl-dC in [%] = $5\text{-Methyl-dC} / (5\text{-Methyl-dC} + \text{dC}) \times 100$.

7.2.9 Zellproliferationsassay

In 96-well Platten (*Greiner bio-one*, transparenter Boden) wurden 2000 HCT116-Zellen pro Well in 100 μL DMEM Medium eingesät (Tag 1). An den Tagen 2, 3 und 4 wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Nukleosiden versetzt. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die lediglich mit Medium versetzt wurden. An Tag 5 wurde die Zellproliferation quantifiziert. **WST-1 Assay:** Hierbei wird die Lebensfähigkeit der Zellen mit einem kolorimetrischen Assay, basierend auf der Spaltung des Tetrazoliumsalzes WST-1 (Zellproliferationsreagenz, *Roche*) durch mitochondriale Dehydrogenasen, entsprechend den Herstellerangaben bestimmt. Hierzu wurden die Zellen mit 100 μL PBS Puffer gewaschen, mit 100 μL frischem Medium sowie 10 μL WST-1 versetzt und bei 37 °C inkubiert. OD₄₅₀- und OD₆₃₀-Werte wurden mit einem *Tecan* Multiwellphotospektrometer gemessen. Die Absorption korreliert hierbei direkt mit der Lebensfähigkeit der behandelten Zellen. Die Ergebnisse sind prozentual in Relation zur Negativkontrolle angegeben (Negativkontrolle = 100 %). Alle Ansätze wurden dreifach ausgeführt.

7.2.10 Kolokalisationsstudien

Die Kolokalisationsstudien wurden von Dr. *Lothar Schermelleh*, Arbeitskreis Prof. *H. Leonhardt* (Department für Biologie II, LMU München), durchgeführt.^[294]

Zellkultur und Transfektion: C2C12 Mäuse Myoblasten wurden in DMEM Medium mit 20 % FKS und 50 µg/mL Gentamycin kultiviert. Zur Transfektion wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von etwa 40 % gezogen und mit HiPerFect Transfektionsmittel (*Qiagen*) entsprechend den Herstellerangaben transfiziert.

Antikörperfärbung und Fluoreszenzmikroskopie: 16 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 3.7 % Formaldehyd in PBS fixiert (10 min bei Raumtemperatur) und mit 0.5 % Triton X-100 in PBS für 3 min permeabilisiert. Endogenes DNMT1 wurde mit einem affinitätsgereinigten polyklonalen Antiserum gegen die N-terminale Domäne von Mäuse-DNMT1 und sekundären Antikörpern mit Alexa Fluor 488 (*Molecular Probes/Invitrogen*) detektiert. Die Zellen wurden außerdem mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) gegengefärbt und in Vectashield Medium (*Vector Labs*) eingebettet. Mikroskopiert wurde mit einem Axiophot 2 Epifluoreszenzmikroskop (*Zeiss*), ausgestattet mit entsprechenden Bandpassfiltersets, einem 63x/1.4 NA Plan-Apochromatobjektiv und einer MicroMax gekühlten 14-bit CCD Kamera (*Roper Scientific*).

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

A	2'-Desoxyadenosin (in DNA-Strängen); kursiv: Integral
Å	Angström
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ac	Acetyl
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AcOH	Essigsäure
AdoMet	S-Adenosylmethionin (auch: SAM)
AdoHcy	S-Adenosylhomocystein
Ar	Argon
ATP	Adenosintriphosphat
ATT	6-Aza-2-thiothymin
AU	<i>arbitrary units</i>
B	in DNA-Strängen: Biotin
BAH	<i>bromo-adjacent homology</i>
BER	Basenexcisionsreparatur
ber.	berechnet
BOC	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
bp	Basenpaare (<i>Base Pairs</i>)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BTT	5-Benzylthiotetrazol
BuLi	Butyllithium
Bz	Benzoyl
C	in DNA-Strängen: 2'-Desoxycytidin
carbdC ^N	carbozyklisches 5-Aza-2'-desoxycytidin
CD	Zirkulardichroismus
CE	<i>capillary electrophoresis</i>
CEP	β-Cyanoethyl-Phosphoramidit
Chol	Cholesteryl
cm	Zentimeter
CMS	Kolloidale mesoporöse Silikapartikel
C ^N	5-Azacytidin; in DNA-Strängen: 5-Aza-2'-desoxycytidin
CpG	dC, am 3'-OH über einen Phosphatrest (-PO ₂ -) verknüpft mit dem 5'OH von dG
CPG	<i>Controlled Pore Glass</i>
CT	<i>calf thymus</i>
Cy3	Cyaninfarbstoff (<i>Trademark of GE Healthcare</i>)
Cys	Cystein
Δ	NMR: chemische Verschiebung; Reaktionsbedingungen: Erwärmung

d	Tage, NMR: Dublett
dA	2'-Desoxyadenosin
Da	Dalton
DB	<i>Dumbbell</i> (Engl. Für Hantel)
dC	2'-Desoxycytidin
DC	Dünnschichtchromatographie
DCA	Dichloressigsäure (<i>dichloroacetic acid</i>)
dC ^F	5-Fluor-2'-desoxycytidin
dC ^F TP	5-Fluor-2'-desoxycytidin-5'-triphosphat
dC ^F MP	5-Fluor-2'-desoxycytidin-5'-monophosphat
dC ^M	5-Methyl-2'-desoxycytidin
DCM	Dichlormethan
dC ^N	5-Aza-2'-desoxycytidin
dC ^N TP	5-Aza-2'-desoxycytidin-5'-triphosphat
dG	2'-Desoxyguanosin
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DIEA	Diisopropylethylamin
DMAP	<i>N,N</i> -4-Dimethylaminopyridin
DMAP1	<i>Dnmt1 Associated Protein</i>
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	4, 4'-Dimethoxytrityl-
DMTCI	4, 4'-Dimethoxytritylchlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DNMT	DNA-Methyltransferase
DS	Doppelstrang
dU	2'-Desoxyuridin
dU ^F	5-Fluor-2'-desoxyuridin
dU ^F MP	5-Fluor-2'-desoxyuridin-5'-monophosphat
ε	Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EI	Elektronenstoßionisation (<i>Electron Impact Ionisation</i>)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
eq.	Äquivalente
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>et al.</i>	und andere
Et ₂ O	Diethylether
EtOAc	Essigsäureethylester
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
FAB	<i>Fast Atom Bombardment</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FI	Fluorescein

FKS	Fötales Kälber Serum
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FRET	Förster Resonanz Energie Transfer
FTICR	<i>Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance</i> (Massenspektrometrie)
FT-IR	Fourier Transform-Infrarotspektroskopie
G	in DNA Strängen: 2'-Desoxyguanosin, klein: Gramm
gDNA	genomische DNA
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
GK	Glycin-Lysin
h	Stunden
H	Histon
HAT	Histonacetyltransferasen
HATU	2-(7-Aza-1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphat
HCA	α -Cyanohydroxymethylsäure (α -Hydroxycinnamic Acid)
HDAC	Histon-Deacetylasen
HDM	Histon-Demethylasen
HK	Histon-Kinasen
HKMT	Histon-Lysin-Methyltransferasen
HMDS	Hexamethyldisilazan
HMT	Histon-Methyltransferasen
HOAc	Essigsäure
HP	<i>Hairpin</i>
HPA	3-Hydroxypicolinsäure
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRMS	Hochaufgelöste Massenspektrometrie (<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>)
HV	Hochvakuum
Hz	Hertz
I	Intensität
<i>i</i> Bu	Isobutyryl
<i>i</i> Pr	Isopropyl
J.	Jahr
<i>J</i>	Kopplungskonstante (Angabe in Hz)
K	Lysin
kDa	Kilodalton
KLSM	Konfokale <i>Laser-Scanning</i> Mikroskopie
konz.	konzentriert
L	Liter
λ	lambda; Wellenlänge (Angabe in nm)
LINE	<i>Long Interspersed Nuclear Elements</i>
LNA	<i>Locked Nucleic Acids</i>
LOI	<i>Loss Of Imprinting</i>

M	Molekulargewicht bzw. molar; MS: Molekülion; in Gelen: Gewichtsmarker; klein: Meter; IR: <i>medium</i> ; NMR: Multiplett
mA	Milliampere
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight</i>
max.	Maximal
mbar	Millibar
MBP	<i>Methyl-CpG Binding Protein</i>
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MeS	Methylmercapto
mg	Milligramm
min	Minute
Mio.	Millionen
mM	millimolar
mmol	Millimol
MOE	2'-O-Methoxy-ethyl
Mol.	<i>Molecular</i>
MP	Monophosphat
Mrd.	Milliarden
mRNA	Boten RNA (<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>)
MS	Massenspektrum, Massenspektrometrie
m/z	Verhältnis Masse/Ladung
NER	Nukleotidexcisionsreparatur
NEt ₃	Triethylamin
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NLS	Nuclear Localization Signal
nm	Nanometer
NMR	Kernresonanz (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
ns	Nanosekunden
8-oxo-dG	8-Hydroxydesoxyguanosin
P	Phosphat; klein: piko
<i>p</i>	para
p. a.	<i>pro analysi</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAR	Poly(ADP-Ribose)
PARG	Poly(ADP-Ribose)-Glycohydrolasen
PC	Prolin-Cystein Dipeptid
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
Pmb	Paramethoxybenzyl

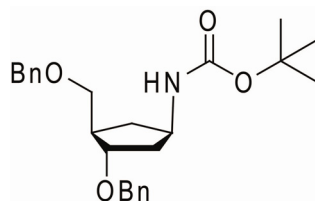
Pmc	2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl
pmol	Pikomol
PNA	<i>Peptide Nucleic Acid</i>
PO	Phosphordiester
PP	Phosphatase
ppm	<i>parts per million</i>
PRO	Protoonkogen
PS	Phosphorothioat
PTM	Posttranslationale Modifikation
PWWP	Prolin-Tryptophan-Tryptophan-Prolin
Py	Pyridin
q	NMR: Quartett
quant.	Quantitativ
R_f	Retentionsfaktor
refl.	Rückfluss (<i>reflux</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic Acid</i>)
RNAi	RNA-Interferenz
RP	<i>Reversed Phase</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde; IR: <i>strong</i> ; NMR: Singulett
SAM	S-Adenosylmethionin (auch: AdoMet)
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i>
SINE	<i>Short Interspersed Nuclear Elements</i>
SUMO	<i>Small Ubiquitin-Related Modifier</i>
T	Temperatur; in DNA Strängen: Thymidin; klein (NMR): Triplett
Tab.	Tabelle
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TBE	Tris-Borat-EDTA
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TBAF	Tetra- <i>n</i> -butylammoniumfluorid
TBTA	Tris(benzyltriazolylmethyl)amin
TDG	Thymin DNA Glykosylase
TEAA	Triethylammoniumacetat
TEAB	Triethylammoniumbicarbonat
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TFA	Trifluoressigsäure (<i>Trifluoroacetic acid</i>)
THF	Tetrahydrofuran
THU	Tetrahydrouridin
TIC	<i>Total Ion Count</i>
TIPS	Triisopropylsilan
TM	<i>Trademark</i>
TMS	Trimethylsilyl

TMP	2,4,6-Trimethylphenyl
Tol	Toluoyl
TOF	<i>Time Of Flight</i>
Tos	Tosyl
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRD	Transkriptionsrepressor Domäne
TP	Triphosphat
T _s	Siedetemperatur
TSG	Tumorsuppressorgen
U	Uridin, bzw. in DNA: 2'-Desoxyuridin; Enzyme: <i>Units</i>
UBPs	Ubiquitin-Hydrolasen
UPA	<i>Urokinase Plasminogen Activator</i>
UV	ultraviolett
Vis	<i>Visible</i>
vs	IR: <i>very strong</i>
vs.	Versus
w	IR: <i>weak</i>
Wt.	<i>Weight</i>
X	in DNA Strängen: Diazirin-dU-Nukleotid
z	MS: Ladungszahl

8.2 Synthese des carbozyklischen 5-Aza-2'-desoxycytidins (15)

Die folgenden Synthesen wurden von A. Gégout durchgeführt.

(3-Benzyloxy-4-benzyloxymethyl-cyclopentyl)-carbamic acid tert-butyl ester (17)

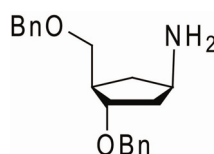


A stirred solution of **16** (0.38 g, 1.64 mmol) in DMF abs. (12 mL) was treated with NaH (95 mg, 3.94 mmol) at 0 °C. After 30 min benzylbromide (0.50 mL, 4.26 mmol) was slowly added and the mixture was stirred at 0 °C for 3 h. The reaction mixture was then quenched by adding a few drops of MeOH, diluted with CH₂Cl₂ (80 mL) and washed with saturated aq. NaHCO₃ solution (3 x 80 mL) and water (3 x 80 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and reduced to dryness. The residue

was purified by silica gel column chromatography using hexane:EtOAc (4:1) as eluant to give **17** (350 mg, 52 %) as a white solid.

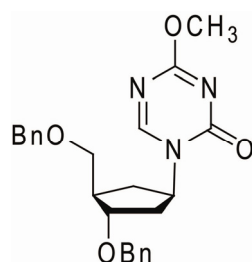
R_f = 0.37 (Hexanes–EtOAc, 4:1); δ_H (600 MHz, $CDCl_3$) 7.27-7.35 (10 H, m, Ar), 4.81 (1 H, br s, NH), 4.51 (1 H, d, J = 12.0 Hz, CHHPh), 4.50 (2 H, s, CH_2 Ph), 4.42 (1 H, d, J = 12.0 Hz, CHHPh), 4.12 (1 H, q, J = 6.0 Hz, C(1)H), 3.91 (1 H, m, C(3)H), 3.47 (2 H, m, CH_2 OBn), 2.29 (2 H, m, C(5) H_a and C(2) H_a), 2.08 (1 H, m, C(4)H), 1.73 (1 H, m, C(2) H_b), 1.42 (9 H, s, t Bu), 1.26 (1 H, m, C(5) H_b); δ_C (150 MHz, $CDCl_3$) 157.5 (CO), 138.8 (ArC), 138.4 (ArC), 128.6 (ArCH x 2), 128.5 (ArCH x 2), 127.9 (ArCH x 2), 127.8 (ArCH x 2), 127.6 (ArCH x 2), 81.1 (C3), 73.4 (CH_2 Ph), 71.9 (CH_2 OBn), 71.3 (CH_2 Ph), 60.9 ($C(CH_3)_3$), 50.3 (C1), 45.0 (C4), 39.6 (C2), 35.0 (C5), 28.6 (CH_3 x 3); m/z (ESI⁺) 412.2484 (MH⁺, $C_{25}H_{34}NO_4^+$ requires 412.2487).

3-Benzyloxy-4-benzyloxymethyl-cyclopentylamine (**18**)



17 (0.35g, 0.85 mmol) was treated with a 30 % CH_2Cl_2 solution of trifluoroacetic acid (2 mL) at 0 °C. The reaction was stirred at room temperature until disappearance of the starting material. The volatiles were removed under vacuum and the residue was treated with a 10 % K_2CO_3 solution (10 mL) and extracted 3 times with EtOAc (25 mL). The pooled organic extracts were dried over Na_2SO_4 , filtered and reduced to dryness to give **18** (259 mg, 98 %) as a colourless oil without further purification. The compound is immediately used in the next step.

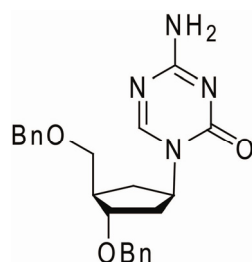
1-(3-Benzyloxy-4-benzyloxymethyl-cyclopentyl)-4-methoxy-1*H*-[1,3,5]triazin-2-one (20)



A solution of **18** (0.43 g, 1.38 mmol) and 2-Methyl-1-(1-imidazolcarbonyl)-isourea **19** (0.28 g, 1.66 mmol) in acetonitrile (16 mL) was heated at reflux for 2 h. After the reaction mixture was concentrated to a thick oil, trimethyl orthoformate (8.6 mL) was added and the resulting solution was heated at reflux for 2 h in the presence of a catalytic amount of trifluoroacetic acid. The solvent was removed under reduced pressure and the residual oil was purified by silica gel column chromatography using hexane:EtOAc (1:1) as eluant to give **20** (200 mg, 34 %) as a white oil.

$R_f = 0.24$ (Hexane–EtOAc, 1:1); $\tilde{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 1712 s (CO); δ_{H} (600 MHz, CDCl_3) 8.23 (1 H, s, C(6)*H*), 7.28–7.36 (10 H, m, Ar), 4.98 (1 H, m, C(3')*H*), 4.50 (2 H, s, CH_2Ph), 4.49 (1 H, AB d, $J = 12.0$ Hz, CHHPh), 4.45 (1 H, AB d, $J = 12.0$ Hz, CHHPh), 4.00 (1 H, m, C(1')*H*), 4.00 (3 H, s, OCH_3), 3.54 (2 H, m, CH_2Ph), 2.44 (2 H, m, C(5')*H*_a and C(2')*H*_a), 2.27 (1 H, m, C(2')*H*_b), 2.12 (1 H, m, C(4')*H*), 1.75 (1 H, m, C(5')*H*_b); δ_{C} (150 MHz, CDCl_3) 169.7 (C2), 158.2 (C6), 154.7 (C2), 138.1 (ArC), 137.9 (ArC), 128.5 (ArCH x 2), 128.4 (ArCH x 2), 127.8 (ArCH x 2), 127.7 (ArCH x 2), 127.6 (ArCH x 2), 80.2 (C3'), 73.3 (CH_2Ph), 71.1 (CH_2OBn , CH_2Ph), 56.7 (C1'), 55.8 (OCH_3), 44.7 (C4'), 36.7 (C2'), 32.4 (C5'); m/z (ESI⁺) 422.2078 (MH^+ , $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_4^+$ requires 422.2079).

4-Amino-1-(3-benzyloxy-4-benzyloxymethyl-cyclopentyl)-1*H*-[1,3,5]triazin-2-one (21)

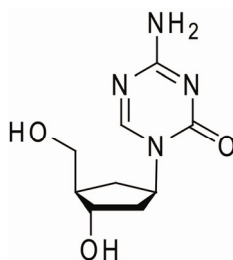


A solution of **20** (0.25 g, 0.59 mmol) in saturated methanolic ammonia (60 mL) was stirred at room temperature in a closed container for 3h. The reaction mixture was

evaporated and a crystallization was performed in EtOAc to give **21** (216 mg, 90 %) as a white crystalline solid.

$\tilde{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 1712 s (CO); δ_{H} (600 MHz, CDCl_3) 8.02 (1 H, s, C(6)*H*), 7.27-7.35 (10 H, m, Ar), 7.03 (1 H, br s, NH_2), 5.59 (1 H, br s, NH_2), 4.87 (1 H, m, C(3')*H*), 4.50 (2 H, s, CH_2Ph), 4.49 (1 H, AB d, $J = 12.0$ Hz, CHHPh), 4.45 (1 H, AB d, $J = 12.0$ Hz, CHHPh), 4.00 (1 H, m, C(1')*H*), 3.52 (2 H, br d, $J = 6.0$ Hz, CH_2Ph), 2.38 (2 H, m, C(5')*H*_a and C(2')*H*_a), 2.22 (1 H, m, C(2')*H*_b), 2.13 (1 H, m, C(4')*H*), 1.75 (1 H, m, C(5')*H*_b); δ_{C} (150 MHz, CDCl_3) 165.8 (C4), 156.8 (C6), 154.2 (C2), 138.2 (ArC), 138.1 (ArC), 128.4 (ArCH x 2), 128.3 (ArCH x 2), 127.7 (ArCH x 2), 127.6 (ArCH x 4), 80.2 (C3'), 73.2 (CH_2Ph), 71.3 (CH_2OBn), 71.0 (CH_2Ph), 56.5 (C1'), 44.8 (C4'), 36.6 (C2'), 32.3 (C5'); m/z (ESI^+) 407.2080 (MH^+ , $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_3^+$ requires 407.2083).

4-Amino-1-(3-hydroxy-4-hydroxymethyl-cyclopentyl)-1*H*-[1,3,5]triazin-2-one (**15**)



A stirred solution of **21** (0.35 g, 0.86 mmol) in CH_2Cl_2 (50 mL) was cooled to -78°C and treated with a 1 M solution of BCl_3 in CH_2Cl_2 (6 mL). After 30 min the mixture was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography using CH_2Cl_2 :MeOH (9:1) as eluant. The resulting solid was recrystallized from EtOH to give **15** (117 mg, 60 %) as a white crystalline solid.

$R_f = 0.37$ (CH_2Cl_2 –MeOH, 9 : 1); $\tilde{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 1712 s (CO); δ_{H} (600 MHz, d_6 -DMSO) 8.30 (1 H, s, C(6)*H*), 7.36 (2 H, s, NH_2), 4.75 (1 H, m, C(1')*H*), 4.70 (1 H, d, $J = 6.4$ Hz, CHOH), 4.58 (1 H, t, $J = 6.4$ Hz, CH_2OH), 3.99 (1 H, m, C(3')*H*), 3.48 (1 H, m, CHHOH), 3.36 (1 H, m, CHHOH), 2.11 (1 H, m, C(5')*H*_a), 2.02 (1 H, m, C(2')*H*_a), 1.88 (1 H, m, C(2')*H*_b), 1.80 (1 H, m, C(4')*H*), 1.48 (1 H, m, C(5')*H*_b); δ_{C} (100 MHz, MeOD) 166.2 (C4), 157.5 (C6), 155.5 (C2), 72.3 (C3'), 62.9 (CH_2OH), 56.0 (C1'), 49.0 (C4'), 38.5 (C2'), 32.0 (C5'); m/z (ESI^+) 227.1141 (MH^+ , $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_3^+$ requires 227.1144).

8.3 Synthese der nanoporösen Silikapartikel und fluoreszenzspektroskopische Experimente

Die Synthese der nanoporösen Silikapartikel sowie die fluoreszenzspektroskopischen Experimente wurden von A. *Schloßbauer* (Arbeitsgruppe *Bein*) durchgeführt.

Applied chemicals

Tetraethylorthosilicate (TEOS, Fluka, >99%), (3-chloropropyl)-trimethoxysilane (CITMS, Fluka, 95%), cetyltrimethylammonium bromide (CTAC, Fluka, 25% in H₂O), Triethanolamine (TEA, Aldrich, 98%), Sodium azide (NaN₃, Fluka, 99%), Avidin from egg white (Sigma, lyophilized powder), Fluorescein sodium salt (Fluka, standart for fluorescence), N,N-dimethylformamide (DMF, Sigma, < 99.8 %). All chemicals were used as received without further purification. Doubly distilled water from a Millipore system (Milli-Q Academic A10) was used for all synthesis and purification steps. DNA oligomers were received as a gift from Baseclick GmbH.

Preparation of colloidal mesoporous silica nanoparticles (CMS)

Mesoporous silica nanoparticles were prepared according to literature from reaction mixtures with a molar composition of 1 TEOS: 0.20 CTAC: 10.37 TEA: 130.15 H₂O.^[440] The combined TEOS (1.92 g, 9.22 mmol) and TEA (14.3 g, 95.6 mmol) were heated for 20 minutes at 90 °C without stirring in a 100 mL polypropylene reactor. A solution of CTAC (25 % in water, 2.41 mL, 1.83 mmol) and water (21.7 g, 1.21 mol) preheated to 60 °C was added, and the resulting mixture was stirred at room temperature for 12 hours. After addition of 100 mL ethanol, the mesoporous silica nanoparticles were separated by centrifugation, redispersed in ethanol and extracted according to the procedure described below.

General procedure for the selective functionalization of CMS with 3-chloropropyl moieties by co-condensation (CMS-Cl)^[431]

The reactants were mixed following the synthesis procedure for CMS. However, a second set of reactants was added at 30 minutes after combination of the initial TEOS/TEA and CTAC solutions. The reactants were added to the stirred reaction mixture with an Eppendorf micropipette and consist of TEOS and (3-chloropropyl)-trimethoxysilane (CITMS) in the molar ratio 1 : 1. The combined amount of both

silanes was 185 μmol , i.e. 2 % of the total amount of “Si” in the initial CMS synthesis. The resulting mixture was stirred at room temperature for 12 hours followed by purification and extraction as described for CMS.

Extraction of CMS

Extraction of the organic template from the CMS materials was performed by heating the colloidal suspensions containing 250 mg of CMS for 45 minutes under reflux at 90°C in a solution containing 2 g ammonium nitrate in 100 mL ethanol, followed by 45 minutes under reflux in a solution of 4 g concentrated hydrochloric acid in 100 mL ethanol. The CMS materials were separated by centrifugation and washed with ethanol after each extraction step. CMS materials were obtained as clear ethanolic suspensions.

Synthesis of azide-functionalized CMS (CMS-N₃)

100 mg of the extracted sample CMS-Cl were washed with anhydrous DMF for three times. Finally, the particles redispersed in 20 mL of anhydrous DMF and transferred into a 100 mL Schlenk flask under nitrogen atmosphere. The resulting suspension was then saturated with NaN₃. The reaction mixture was stirred at 80°C for five hours. The amount of 50 mL water was then added. The particles were then washed with 50 mL water for three times via centrifugation and then redispersed in 20 mL of water, yielding sample CMS-N₃.

Fluorescence spectroscopy

Fluorescence experiments were performed in order to show the time-dependent release of fluorescein from the mesopores of colloidal mesoporous silica spheres. The measurements were recorded on a PTI fluorescence system featuring a PTI 814 photomultiplier detector and an PTI A1010B Xenon arclamp driven by a PTI LPS-220B lamp power supply. For temperature settings, a Quantum Northwest TC 125 sample holder was used. Fluorescein sodium salt was excited with 490 nm and showed a maximum of emission at 511 nm (excitation slit 1.0 mm, emission slit 1.0 mm, Integration 0.5 sec). For the release experiment, a ROTH Visking Typ 8/32 dialysis membrane with a molecular cut-off of 14000 g/mol was used.

8.4 Literaturverzeichnis

- [1] http://map.gsfc.nasa.gov/universe/uni_age.html.
- [2] R. F. Gesteland, T. R. Cech, J. F. Atkins, *The RNA World*, 3 ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **2006**.
- [3] Mit freundlicher Genehmigung der Geologischen Bundesanstalt, A-1030 Wien, Österreich, <http://www.geologie.ac.at/>.
- [4] F. Miescher, *Hoppe-Seyler's medicinisch-chemische Untersuchungen* **1871**, 4, 441-460. Ueber die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen.
- [5] P. A. Levene, *J. Biol. Chem.* **1917**, 31, 591-598. The structure of yeast nucleic acid.
- [6] P. A. Levene, *J. Biol. Chem.* **1920**, 41, 481-492. Properties of the nucleotides obtained from yeast nucleic acids.
- [7] O. T. Avery, C. M. MacLeod, M. McCarty, *J. Exp. Med.* **1944**, 79, 137-158. Chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus Type III.
- [8] E. Chargaff, *Experientia* **1950**, 6, 201-209. Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation.
- [9] R. E. Franklin, R. G. Gosling, *Nature* **1953**, 172, 156-157. Evidence for 2-chain helix in crystalline structure of sodium deoxyribonucleate.
- [10] J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737-738. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid.
- [11] B. Alberts, D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*, WILEY-VCH, Weinheim, **1999**.
- [12] http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/project/about.shtml.
- [13] R. Knippers, *Molekulare Genetik*, 8 ed., Thieme, Stuttgart, **2001**.
- [14] D. A. Micklos, *DNA Science*, 2 ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, **2003**.
- [15] A. D. Goldberg, C. D. Allis, E. Bernstein, *Cell* **2007**, 128, 635-638. Epigenetics: A landscape takes shape.
- [16] A. Bird, *Nature* **2007**, 447, 396-398. Perceptions of epigenetics.
- [17] E. Bernstein, A. Meissner, E. S. Lander, *Cell* **2007**, 128, 669-682. The Mammalian Epigenome.
- [18] W. Reik, *Nature* **2007**, 447, 425-432. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development.
- [19] A. P. Feinberg, B. Tycko, *Nat. Rev. Genet.* **2004**, 4, 143-153. The history of cancer epigenetics.
- [20] E. Bernstein, C. D. Allis, *Genes Dev.* **2005**, 19, 1635-1655. RNA meets chromatin.
- [21] W. Nellen, C. Hammann, *Small RNAs*, Springer-Verlag, Heidelberg, **2005**.
- [22] N. Tsankova, W. Renthall, A. Kumar, E. J. Nestler, *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, 8, 355-367. Epigenetic regulation in psychiatric disorders.
- [23] V. G. Allfrey, R. Faulkner, A. E. Mirsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1964**, 51, 786-794. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis.
- [24] H. T. Spotswood, B. M. Turner, *J. Clin. Invest.* **2002**, 110, 577-582. An increasing complex code.
- [25] M. Spivakov, A. G. Fisher, *Nat. Rev. Genet.* **2007**, 8, 263-271. Epigenetic signatures of stem-cell identity.

- [26] S. L. Berger, *Nature* **2007**, *447*, 407-412. The complex language of chromatin regulation during transcription.
- [27] M. B. Biel, V. Wascholowski, A. Giannis, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 3248-3280. Epigenetik - ein Epizentrum der Genregulation: Histone und histonmodifizierende Enzyme.
- [28] P. Cheung, C. D. Allis, P. Sassone-Corsi, *Cell* **2000**, *103*, 263-271. Signaling to chromatin through histone modification.
- [29] B. M. Turner, *Cell* **2002**, *111*, 285-291. Cellular memory and the histone code.
- [30] Y. Zhang, D. Reinberg, *Genes Dev.* **2001**, *15*, 2343-2360. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails.
- [31] E. V. Benevolenskaya, *Biochem. Cell Biol.* **2007**, *85*, 435-443. Histone H3K4 demethylases are essential in development and differentiation.
- [32] A. Sparmann, M. v. Lohuizen, *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 846-856. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer.
- [33] M. Esteller, *Nat. Rev. Genet.* **2007**, *8*, 286-298. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps.
- [34] R. D. Hotchkiss, *J. Biol. Chem.* **1948**, *175*, 315-332. The quantitative separation of purines, pyrimidines and nucleosides by paper chromatography.
- [35] E. Li, C. Beard, R. Jaenisch, *Nature* **1993**, *366*, 362-365. Role for DNA methylation in genomic imprinting.
- [36] C. Beard, E. Li, R. Jaenisch, *Genes Dev.* **1995**, *9*, 2325-2334. Loss of methylation activates Xist in somatic but not in embryonic cells.
- [37] B. Panning, R. Jaenisch, *Genes Dev.* **1996**, *10*, 1991-2002. DNA hypomethylation can activate Xist expression and silence X-linked genes.
- [38] S. U. Kass, D. Pruss, A. P. Wolffe, *Trends Genet.* **1997**, *13*, 444-449. How does DNA methylation repress transcription?
- [39] J. Goffin, E. Eisenhauer, *Ann. Oncol.* **2002**, *13*, 1699-1716. DNA methyltransferase inhibitors-state of the art.
- [40] J. A. Yoder, C. P. Walsh, T. H. Bestor, *Trends Genet.* **1997**, *13*, 335-340. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites.
- [41] S. Gonzalo, I. Jaco, M. F. Fraga, T. Chen, E. Li, M. Esteller, M. A. Blasco, *Nat. Cell Biol.* **2006**, *8*, 416-424. DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells.
- [42] Z. Siegfried, H. Cedar, *Curr. Biol.* **1997**, *7*, R305-307. DNA methylation: A molecular lock.
- [43] E. Li, *Nat. Rev. Genet.* **2002**, *3*, 662-673. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development.
- [44] G. Egger, G. Liang, A. Aparicio, P. A. Jones, *Nature* **2004**, *429*, 457-463. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy.
- [45] K. D. Robertson, *Nat. Rev. Genet.* **2005**, *6*, 597-610. DNA methylation and human disease.
- [46] P. M. Das, R. Singal, *J. Clin. Oncol.* **2004**, *22*, 4632-4642. DNA methylation and cancer.
- [47] A. P. Feinberg, *Nature* **2007**, *447*, 433-440. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease.
- [48] J. G. Herman, S. B. Baylin, *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349*, 2042-2054. Gene silencing in cancer in association with promotor hypermethylation.
- [49] D. A. Low, N. J. Weyand, M. J. Mahan, *Infect. Immun.* **2001**, *69*, 7197-7204. Roles of DNA adenine methylation in regulating bacterial gene expression and virulence.

- [50] M. Caserta, W. Zacharias, D. Nawenko, G. G. Wilson, R. D. Wells, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 4770-4777. Cloning, sequencing, in vivo promotor mapping, and expression in *Escherichia coli* of the gene for the HhaI methyltransferase.
- [51] A. Jeltsch, *ChemBioChem* **2002**, 3, 274-293. Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases.
- [52] D. K. Ho, J. C. Wu, D. V. Santi, H. G. Floss, *Archives of Biochem. and Biophys.* **1991**, 284, 264-269. Stereochemical studies of the C-methylation of deoxycytidine catalyzed by HhaI methylase and the N-methylation of deoxyadenosine catalyzed by EcoRI methylase.
- [53] G. G. Wilson, N. E. Murray, *Annu. Rev. Genet.* **1991**, 25, 585-627. Restriction and modification systems.
- [54] R. Singal, G. D. Ginder, *Blood* **1999**, 93, 4059-4070. DNA methylation.
- [55] Y. Q. Li, P. Z. Zhou, X. D. Zheng, C. P. Walsh, G. L. Xu, *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35, 390-400. Association of Dnmt3a and thymine DNA glycosylase links DNA methylation with base-excision repair.
- [56] M. L. Gonzalgo, G. Liang, C. H. S. III, J. M. Zingg, W. M. R. III, P. A. Jones, *Cancer Res.* **1997**, 57, 594-599. Identification and characterization of differentially methylated regions of genomic DNA by methylation-sensitive arbitrarily primed PCR.
- [57] F. Antequera, A. Bird, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 11995-11999. Number of CpG islands and genes in human and mouse.
- [58] S. H. Cross, A. P. Bird, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1995**, 5, 309-314. CpG islands and genes.
- [59] J. P. Issa, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, 4, 988-993. CpG island methylator phenotype in cancer.
- [60] M. G. Goll, T. H. Bestor, *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, 74, 481-514. Eukaryotic cytosine methyltransferases.
- [61] M. Okano, S. Xie, E. Li, *Nucleic Acids Res* **1998**, 26, 2536-2540. Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells.
- [62] M. Okano, S. Xie, E. Li, *Nature Genet.* **1998**, 19, 219-220. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases.
- [63] S. Kumar, X. Cheng, S. Klimasauskas, S. Mi, J. Posfai, R. J. Roberts, G. G. Wilson, *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 1-10. The DNA (cytosine-5) methyltransferases.
- [64] D. Jia, R. Z. Jurkowska, X. Zhang, A. Jeltsch, X. Cheng, *Nature* **2007**, 449, 248-251. Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation.
- [65] I. Suetake, F. Shinozaki, J. Miyagawa, H. Takeshima, S. Tajima, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 27816-27823. DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction.
- [66] D. Bourc'his, G. L. Xu, C. S. Lin, B. Bollman, T. H. Bestor, *Science* **2001**, 294, 2436-2539. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints.
- [67] M. S. Kareta, Z. M. Botello, J. J. Ennis, C. Chou, F. Chedin, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 25893-25902. Reconstitution and mechanism of the stimulation of de novo methylation by human DNMT3L.
- [68] S. K. Ooi, C. Qiu, E. Bernstein, K. Li, D. Jia, Z. Yang, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, S. P. Lin, C. D. Allis, X. Cheng, T. H. Bestor, *Nature* **2007**, 448, 714-717. DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA.

- [69] M. G. Goll, F. Kirpekar, K. A. Maggert, J. A. Yoder, C. L. Hsieh, X. Zhang, K. G. Golic, S. E. Jacobsen, T. H. Bestor, *Science* **2006**, *311*, 395-398. Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2.
- [70] T. P. Jurkowski, M. Meusburger, S. Phalke, M. Helm, W. Nellen, G. Reuter, A. Jeltsch, *RNA* **2008**, *14*, 1663-1670. Human DNMT2 methylates tRNA^{Asp} molecules using a DNA methyltransferase-like catalytic mechanism.
- [71] R. J. Klose, A. P. Bird, *Trends Biochem. Sci.* **2006**, *31*, 89-97. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators.
- [72] C. Qiu, K. Sawada, X. Zhang, X. Cheng, *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 217-224. The PWWP domain of mammalian DNA methyltransferase Dnmt3b defines a new family of DNA-binding folds.
- [73] M. Okano, D. W. Bell, D. A. Haber, E. Li, *Cell* **1999**, *99*, 247-257. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development.
- [74] W. Reik, W. Dean, J. Walter, *Science* **2001**, *293*, 1089-1093. Epigenetic reprogramming in mammalian development.
- [75] C. Brenner, R. Deplus, c. Didelot, A. Loriot, E. Vire, C. D. Smet, A. Gutierrez, D. Danovi, D. Bernard, T. Boon, P. G. Pelicci, B. Amati, T. Kouzarides, Y. d. Launoit, L. D. Croce, F. Fuks, *EMBO J.* **2005**, *24*, 336-346. Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor.
- [76] C.-L. Hsieh, *BMC Biochemistry* **2005**, *6*, 1-12. The de novo methylation activity of Dnmt3a is distinctly different than that of Dnmt I.
- [77] S. Pradhan, A. Bacolla, R. D. Wells, R. J. Roberts, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 33002-33010. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification and comparison of de novo and maintenance methylation.
- [78] R. Goyal, R. Reinhardt, A. Jeltsch, *Nucleic Acids Res* **2006**, *34*, 1182-1188. Accuracy of DNA methylation pattern preservation by the Dnmt1 methyltransferase.
- [79] H. Leonhardt, A. W. Page, H. U. Weier, T. H. Bestor, *Cell* **1992**, *71*, 865-873. A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei.
- [80] L. Schermelleh, F. Spada, H. P. Easwaran, K. Zolghadr, J. B. Margot, M. C. Cardoso, H. Leonhardt, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 751-756. Trapped in action: direct visualization of DNA methyltransferase activity in living cells.
- [81] O. Mortusewicz, L. Schermelleh, J. Walter, M. C. Cardoso, H. Leonhardt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 8905-8909. Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites.
- [82] K.-Y. Wang, C.-K. J. Shen, *Oncogene* **2004**, *23*, 7898-7902. DNA methyltransferase Dnmt1 and mismatch repair.
- [83] J. Posfai, A. S. Bhagwat, G. Posfai, R. J. Roberts, *Nucleic Acids Res* **1989**, *17*, 2421-2435. Predictive motifs derived from cytosine methyltransferases.
- [84] A. Bacolla, S. Pradhan, R. J. Roberts, R. D. Wells, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 33011-33019. Recombinant human (cytosine-5) methyltransferase. II. Steady-state kinetics reveal allosteric activation by methylated DNA.
- [85] A. Bacolla, S. Pradhan, J. E. Larson, R. J. Roberts, R. D. Wells, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 18605-18613. Recombinant human DNA (cytosine C5) methyltransferase. III. Allosteric control, reaction order, and influence of plasmid topology and triplet repeat length on methylation of the fragile X CGG.CCG sequence.
- [86] J. Flynn, J. F. Glickman, N. O. Reich, *Biochemistry* **1996**, *35*, 7308-7315. Murine DNA cytosine-C5 methyltransferase: pre-steady- and steady-state kinetic analysis with regulatory DNA sequences.

- [87] S. Pradhan, R. J. Roberts, *EMBO J.* **2000**, *19*, 2103-2114. Hybrid mouse-prokaryotic DNA (cytosine-5) methyltransferases retain the specificity of the parental C-terminal domain.
- [88] J. W. M. Lindstrom, J. Flynn, N. O. Reich, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 4912-4919. Reconciling structure and function in HhaI DNA cytosine-C-5 methyltransferase.
- [89] S. Pradhan, P. O. Esteve, *Clin. Immunol.* **2003**, *109*, 6-16. Mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases and their expression.
- [90] I. Callebaut, J. C. Courvalin, J. P. Mornon, *FEBS Lett.* **1999**, *446*, 189-193. The BAH (bromo-adjacent homology) domain: a link between DNA methylation, replication and transcriptional regulation.
- [91] L. S. Chuang, H. I. Ian, T. W. Koh, H. H. Ng, G. Xu, B. F. Li, *Science* **1997**, *277*, 1996-2000. Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1.
- [92] M. Fatemi, A. Hermann, S. Pradhan, A. Jeltsch, *J. Mol. Biol.* **2001**, *309*, 1189-1199. The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA.
- [93] T. H. Bestor, *EMBO J.* **1992**, *11*, 2611-2617. Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain.
- [94] J. B. Margot, A. M. Aguirre-Arteta, B. V. D. Giacco, S. Pradhan, R. J. Roberts, M. C. Cardoso, H. Leonhardt, *J. Mol. Biol.* **2000**, *297*, 293-300. Structure and function of the mouse DNA methyltransferase gene: Dnmt1 shows a tripartite structure.
- [95] L. S. Chuang, H. H. Ng, J. N. Chia, B. F. Li, *J. Mol. Biol.* **1996**, *257*, 935-948. Characterisation of independent DNA and multiple Zn-binding domains at the N terminus of human DNA-(cytosine-5) methyltransferase: modulating the property of a DNA-binding domain by contiguous Zn-binding motifs.
- [96] M. R. Rountree, K. E. Bachman, S. B. Baylin, *Nat. Genet.* **2000**, *25*, 269-277. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci.
- [97] K. D. Robertson, S. Ait-Si-Ali, T. Yokochi, P. A. Wade, P. L. Jones, A. P. Wolffe, *Nat. Genet.* **2000**, *25*, 338-342. DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters.
- [98] F. Fuks, P. J. Hurd, R. Deplus, T. Kouzarides, *Nucleic Acids Res* **2003**, *31*, 2305-2312. The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase.
- [99] H. Kimura, K. Shiota, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 4806-4812. Methyl-CpG-binding protein, MeCP2, is a target molecule for maintenance DNA methyltransferase, Dnmt1.
- [100] M. Szyf, *DNA methylation and cancer therapy*, Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York, **2005**.
- [101] Z. M. Svedruzic, N. O. Reich, *Biochemistry* **2005**, *44*, 9472-9485. DNA cytosine C5 methyltransferase Dnmt1: catalysis-dependent release of allosteric inhibition.
- [102] S. Klimasauskas, S. Kumar, R. J. Roberts, X. Cheng, *Cell* **1994**, *76*, 357-369. HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix.
- [103] R. J. Roberts, X. Cheng, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 181-198. Base flipping.
- [104] M. O'Gara, S. Klimasauskas, R. J. Roberts, X. Cheng, *J. Mol. Biol.* **1996**, *261*, 634-645. Enzymatic C5-cytosine methylation of DNA: mechanistic implications of new crystal structures for HhaI methyltransferase-DNA-AdoHcy complexes.
- [105] L. Zhou, X. Cheng, B. A. Connolly, M. J. Dickman, P. J. Hurd, D. P. Hornby, *J. Mol. Biol.* **2002**, *321*, 591-599. Zebularine: a novel DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases.

- [106] L. Chen, A. M. MacMillan, W. Chang, K. Ezaz-Nikpay, W. S. Lane, G. L. Verdine, *Biochemistry* **1991**, *30*, 11018-11025. Direct identification of the active-site nucleophile in a DNA (cytosine-5)-methyltransferase.
- [107] S. Mi, R. J. Roberts, *Nucleic Acids Res* **1993**, *21*, 2459-2464. The DNA binding affinity of HhaI methylase is increased by a single amino acid substitution in the catalytic center.
- [108] S. Gabbara, D. Sheluho, A. S. Bhagwat, *Biochemistry* **1995**, *34*, 8914-8923. Cytosine methyltransferase from *Escherichia coli* in which active site cysteine is replaced with serine is partially active.
- [109] L. Chen, A. M. MacMillan, G. L. Verdine, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5318-5319. Mutational separation of DNA binding from catalysis in a DNA cytosine methyltransferase.
- [110] H. Weintraub, M. Groudine, *Science* **1976**, *193*, 848-856. Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation.
- [111] K. E. Bachman, B. H. Park, I. Rhee, H. Rajagopalan, J. G. Herman, S. B. Baylin, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, *Cancer Cell* **2003**, *3*, 89-95. Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene.
- [112] P. A. Jones, *Science* **2001**, *293*, 1068-1070. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics.
- [113] K. D. Robertson, *Oncogene* **2002**, *21*, 5361-5379. DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web.
- [114] A. Brero, H. P. Easwaran, D. Nowak, I. Grunewald, T. Cremer, H. Leonhardt, M. C. Cardoso, *J. Cell Biol.* **2005**, *169*, 733-743. Methyl-CpG-binding proteins induce large-scale chromatin reorganization during terminal differentiation.
- [115] F. Watt, P. L. Molloy, *Genes Dev.* **1988**, *2*, 1136-1143. Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter.
- [116] P. H. Tate, A. P. Bird, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1993**, *3*, 226-231. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression.
- [117] X. Nan, F. J. Campoy, A. Bird, *Cell* **1997**, *88*, 471-481. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin.
- [118] X. Nan, H. H. Ng, C. A. Johnson, C. D. Laherty, B. M. Turner, R. N. Eisenman, A. Bird, *Nature* **1998**, *393*, 386-389. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex.
- [119] M. C. Lorincz, D. R. Dickerson, M. Schmitt, M. Groudine, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 1068-1075. Intragenic DNA methylation alters chromatin structure and elongation efficiency in mammalian cells.
- [120] F. Fuks, W. A. Burgers, A. Brehm, L. Hughes-Davies, T. Kouzarides, *Nat. Genet.* **2000**, *24*, 88-91. DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity.
- [121] H. Tamaru, E. U. Selker, *Nature* **2001**, *414*, 277-283. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*.
- [122] H. Tamaru, X. Zhang, D. McMillen, P. B. Singh, J. Nakayama, S. I. Grewal, C. D. Allis, X. Cheng, E. U. Selker, *Nat. Genet.* **2003**, *34*, 75-79. Trimethylated lysine 9 of histone H3 is a mark for DNA methylation in *Neurospora crassa*.
- [123] T. H. Bestor, *Hum. Mol. Genet.* **2000**, *9*, 2395-2402. The DNA methyltransferases of mammals.
- [124] K. E. Bachman, M. R. R. Baylin, B. Stephen, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 32282-32287. Dnmt3a and Dnmt3b are transcriptional repressors that exhibit unique localization properties to heterochromatin.

- [125] H. H. Ng, A. Bird, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1999**, 9, 158-163. DNA methylation and chromatin modification.
- [126] F. Fuks, P. J. Hurd, D. Wolf, X. Nan, A. P. Bird, T. Kouzarides, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 4035-4040. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation.
- [127] S. A. Sarraf, I. Stancheva, *Mol. Cell* **2004**, 15, 595-605. Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly.
- [128] Y. Shi, F. Lan, C. Matson, P. Mulligan, J. R. Whetstine, P. A. Cole, R. A. Casero, Y. Shi, *Cell* **2004**, 119, 941-953. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1.
- [129] Y. Tsukada, J. Fang, H. Erdjument-Bromage, M. E. Warren, C. H. Borchers, P. Tempst, Y. Zhang, *Nature* **2006**, 439, 811-816. Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins.
- [130] Y. Wang, J. Wysocka, J. Sayegh, Y. H. Lee, J. R. Perlin, L. Leonelli, L. S. Sonbuchner, C. H. McDonald, R. G. Cook, Y. Dou, *Science* **2004**, 306, 279-283. Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylation.
- [131] J. R. Whetstine, A. Nottke, F. Lan, M. Huarte, S. Smolikov, Z. Chen, E. Spooner, E. Li, G. Zhang, M. Colaiacovo, Y. Shi, *Cell* **2006**, 125, 467-481. Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases.
- [132] T. Kafri, M. Ariel, M. Brandeis, R. Shemer, L. Urven, J. McCarrey, H. Cedar, A. Razin, *Genes Dev.* **1992**, 6, 705-714. Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line.
- [133] M. Monk, M. Boubelik, S. Lehnert, *Development* **1987**, 99, 371-382. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development.
- [134] W. Mayer, A. Niveleau, J. Walter, R. Fundele, T. Haaf, *Nature* **2000**, 403, 501-502. Demethylation of the zygotic paternal genome.
- [135] M. Gehring, W. Reik, S. Henikoff, *Trends Genet.* **2009**, 25, 82-90. DNA demethylation by DNA repair.
- [136] S. K. Bhattacharya, S. Ramchandani, N. Cervoni, M. Szyf, *Nature* **1999**, 397, 579-583. A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA.
- [137] H. Cedar, G. L. Verdine, *Nature* **1999**, 397, 568-569. The amazing demethylase.
- [138] S. Hamm, G. Just, N. Lacoste, N. Moitessier, M. Szyf, O. Mamer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 1046-1049. On the mechanism of demethylation of 5-methylcytosine in DNA.
- [139] N. Detich, J. Theberge, M. Szyf, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 35791-35794. Promotor-specific activation and demethylation by MBD2/demethylase.
- [140] A. Bird, *Genes Dev.* **2002**, 16, 6-21. DNA methylation patterns and epigenetic memory.
- [141] C. Kress, H. Thomassin, T. Grange, *FEBS Lett.* **2001**, 494, 135-140. Local DNA demethylation in vertebrates: how could it be performed and targeted.
- [142] H. H. Ng, Y. Zhang, B. Hendrich, C. A. Johnson, B. M. Turner, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, D. Reinberg, A. Bird, *Nat. Genet.* **1999**, 23, 58-61. MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex.
- [143] B. Hendrich, J. Guy, B. Ramsahoye, V. A. Wilson, A. Bird, *Genes Dev.* **2001**, 15, 710-723. Closely related proteins MBD2 and MBD3 play distinctive but interacting roles in mouse development.
- [144] S. Kangaspeska, B. Stride, R. Métivier, M. Polycarpou-Schwarz, D. Ibberson, R. P. Carmouche, V. Benes, F. Gannon, G. Reid, *Nature* **2008**, 452, 112-115. Transient cyclical methylation of promotor DNA.

- [145] R. Métivier, R. Gallais, C. Tiffocche, C. L. Peron, R. Z. Jurkowska, R. P. Carmouche, D. Ibberson, P. Barath, F. Demay, G. Reid, *Nature* **2008**, 452, 45-50. Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promotor.
- [146] S. K. T. Ooi, T. H. Bestor, *Cell* **2008**, 133, 1145-1148. The colorful history of active DNA Demethylation.
- [147] Y. Ikeda, T. Kinoshita, *Chromosoma* **2009**, 118, 37-41. DNA demethylation: a lesson from the garden.
- [148] B. Zhu, Y. Zheng, H. Angliker, S. Schwartz, S. Thiry, M. Siegmann, J. P. Jost, *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, 4157-4165. 5-Methylcytosine-DNA glycosylase activity is also present in the human MBD4 (G/T mismatch glycosylase) and in a related avian sequence.
- [149] A. Kapoor, F. Agius, J. Zhu, *FEBS Lett.* **2005**, 579, 5889-5898. Preventing transcriptional gene silencing by active DNA demethylation.
- [150] G. Barreto, A. Schafer, J. Marhold, D. Stach, S. K. Swaminathan, V. Handa, G. Doderlein, N. Maltry, W. Wu, F. Lyko, C. Niehrs, *Nature* **2007**, 445, 671-675. Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation.
- [151] M. Tahiliani, K. Koh, Y. Shen, W. A. Pastor, H. Bandukwala, Y. Brudno, S. Agarwal, L. M. Iyer, D. R. Liu, L. Aravind, A. Rao, *Science* **2009**, 324, 930-935. Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL Partner TET1.
- [152] S. Kriaucionis, N. Heintz, *Science* **2009**, 324, 929-930. The nuclear DNA base 5-Hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain.
- [153] F. Eckhardt, S. Beck, I. G. Gut, K. Berlin, *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2004**, 4, 609-618. Future potential of the Human Epigenome Project.
- [154] A. Murrell, V. K. Rakyan, S. Beck, *Hum. Mol. Genet.* **2005**, 14 Spec No 1, R3-R10. From genome to epigenome.
- [155] P. A. Jones, S. B. Baylin, *Nat. Rev. Genet.* **2002**, 3, 415-428. The fundamental role of epigenetic events in cancer.
- [156] M. Szyf, *Drug Resist. Updat.* **2003**, 6, 341-353. DNA methylation and cancer therapy.
- [157] P. A. Jones, S. B. Baylin, *Cell* **2007**, 128, 683-692. The epigenomics of cancer.
- [158] M. S. Greenblatt, W. B. Bennett, M. Hollstein, C. C. Harris, *Cancer Res.* **1994**, 54, 4855-4878. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis.
- [159] A. P. Feinberg, B. Vogelstein, *Nature* **1983**, 301, 89-92. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts.
- [160] M. A. Gama-Sosa, V. A. Slagel, R. W. Trewyn, R. Oxenhandler, K. C. Kuo, C. W. Gehrke, M. Ehrlich, *Nucleic Acids Res.* **1983**, 11, 6883-6894. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors.
- [161] M. Esteller, *Brit. J. Cancer* **2006**, 94, 179-183. Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes.
- [162] J. M. Teodoridis, J. Hall, S. Marsh, H. D. Kannall, C. Smyth, J. Curto, N. Siddiqui, H. Gabra, H. L. McLeod, G. Strathdee, R. Brown, *Cancer Res.* **2005**, 65, 8961-8967. CpG island methylation of DNA damage response genes in advanced ovarian cancer.
- [163] C. J. Marsit, E. A. Houseman, B. C. Christensen, K. Eddy, R. Bueno, D. J. Sugarbaker, H. H. Nelson, M. R. Karagas, K. T. Kelsey, *Cancer Res.* **2006**, 66, 10621-10629. Examination of a CpG island methylator phenotype and implications of methylation profiles in solid tumors.
- [164] J. F. Costello, C. M. Frühwald, D. J. Smiraglia, L. J. Rush, G. P. Robertson, X. Gao, F. A. Wright, J. D. Feramisco, P. Peltomäki, J. C. Lang, D. E. Schuller, L. Yu, C. D. Bloomfield, M. A. Caligiuri, A. Yates, R. Nishikawa, H.-J. S. Huang, N. J. Petrelli, X.

- Zhang, M. S. O, W. A. Held, W. K. Cavenee, C. Plass, *Nat. Genet.* **2000**, *24*, 132-138. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns.
- [165] J. P. Issa, *Hypermethylation phenotypes in ageing and cancer*, Eaton Publishing, Natick, **2000**.
- [166] A. O. Chan, R. R. Broaddus, P. S. Houlihan, J. P. Issa, S. R. Hamilton, A. Rashid, *Am. J. Pathol.* **2002**, *160*, 1823-1830. CpG island methylation in aberrant crypt foci of the colorectum.
- [167] M. Esteller, *Oncogene* **2002**, *21*, 5427-5440. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future.
- [168] S. B. Baylin, J. E. Ohm, *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 107-116. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction?
- [169] W. H. Liggett, D. Sidransky, *J. Clin. Oncol.* **1998**, *16*, 1197-1206. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer.
- [170] G. A. Otterson, S. N. Khleif, W. Chen, A. B. Coxon, F. J. Kaye, *Oncogene* **1995**, *11*, 1211-1216. CDKN2 gene silencing in lung cancer by DNA hypermethylation and kinetics of p16INK4 protein induction by 5-aza-2'-deoxycytidine.
- [171] N. Ohtani-Fujita, T. Fujita, A. Aoike, N. E. Osifchin, P. D. Robbins, T. Sakai, *Oncogene* **1993**, *8*, 1063-1067. CpG methylation inactivates the promotor activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene.
- [172] C. Lengauer, *Science* **2003**, *300*, 442-443. Cancer. An unstable liaison.
- [173] M. Ehrlich, *Oncogene* **2002**, *21*, 5400-5413. DNA methylation in cancer: too much, but also too little.
- [174] M. Widschwendter, G. Jiang, C. Woods, H. M. Muller, H. Fiegl, G. Goebel, C. Marth, E. Muller-Holzner, A. G. Zeimet, P. W. Laird, M. Ehrlich, *Cancer Res.* **2004**, *64*, 4472-4480. DNA hypomethylation and ovarian cancer biology.
- [175] M. Ehrlich, N. E. Hopkins, G. Jiang, J. S. Dome, M. C. Yu, C. B. Woods, G. E. Tomlinson, M. Chintagumpala, M. Champagne, L. Dillerg, D. M. Parham, J. Sawyer, *Cancer Genet. Cytogenet.* **2003**, *141*, 97-105. Satellite DNA hypomethylation in karyotyped Wilms tumors.
- [176] I. M. Smith, C. A. Glazer, S. K. Mithani, M. F. Ochs, W. Sun, S. Bhan, A. Vostrov, Z. Abdullaev, V. Lobanenko, A. Gray, C. Liu, S. S. Chang, K. L. Ostrow, W. H. Westra, S. Begum, M. Dhara, J. Califano, *PLoS ONE* **2009**, *4*, 1-15. Coordinated activation of candidate proto-oncogenes and cancer testes antigens via promoter demethylation in head and neck cancer and lung cancer.
- [177] S. M. K. Pulkuri, N. Estes, J. Patel, J. S. Rao, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 930-939. Demethylation-linked activation of urokinase plasminogen activator is involved in progression of prostate cancer.
- [178] L. D. Senno, I. Maestri, R. Piva, S. Hanau, A. Reggiani, A. Romano, G. Russo, *J. Urol.* **1989**, *142*, 146-149. Differential hypomethylation of the c-myc protooncogene in bladder cancers at different stages and grades.
- [179] J. Vachtenheim, I. Horáková, H. Novotná, *Cancer Res.* **1994**, *54*, 1145-1148. Hypomethylation of CCGG sites in the 3' region of h-ras protooncogene is frequent and is associated with h-ras allele loss in non-small cell lung cancer.
- [180] M. Nishigaki, K. Aoyagi, I. Danjoh, M. Fukaya, K. Yanagihara, H. Sakamoto, T. Yoshida, H. Sasaki, *Cancer Res.* **2005**, *65*, 2115-2124. Discovery of aberrant expression of r-ras by cancer-linked DNA hypomethylation in gastric cancer using microarrays.
- [181] A. P. Feinberg, B. Vogelstein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, *111*, 47-54. Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers.

- [182] P. M. Watt, R. Kumar, U. R. Kees, *Genes Chromosomes Cancer* **2000**, 29, 371-377. Promoter demethylation accompanies reactivation of the HOX11 proto-oncogene in leukemia.
- [183] M. Hanada, D. Delia, A. Aiello, E. Stadtmauer, J. C. Reed, *Blood* **1993**, 82, 1820–1828. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia.
- [184] A. P. Feinberg, H. Cui, R. Ohlsson, *Semin. Cancer Biol.* **2002**, 12, 389-398. DNA methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms.
- [185] A. Slack, N. Cervoni, M. Pinard, M. Szyf, *Cell* **1999**, 54, 275-283. DNA methyltransferase is a downstream effector of cellular transformation triggered by simian virus 40 large T antigen.
- [186] C. N. Tsai, C. L. Tsai, K. P. Tse, H. Y. Chang, Y. S. Chang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 10084-10089. The Epstein–Barr virus oncogene product, latent membrane protein 1, induces the downregulation of E-cadherin gene expression via activation of DNA methyltransferases.
- [187] J. A. Mikovits, H. A. Young, P. Vertino, J. P. Issa, P. M. Pitha, S. Turcoski-Corrales, D. D. Taub, C. L. Petrow, S. B. Baylin, F. W. Ruscetti, *Mol. Cell Biol.* **1998**, 18, 5166-5177. Infection with human immunodeficiency virus type 1 upregulates DNA methyltransferase, resulting in de novo methylation of the gamma interferon (IFN-gamma) promoter and subsequent downregulation of IFN-gamma production.
- [188] V. Valinluck, H. H. Tsai, D. K. Rogstad, A. Burdzy, A. Bird, L. C. Sowers, *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, 4100-4108. Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2).
- [189] V. Valinluck, P. Liu, J. I. Kang, A. Burdzy, L. C. Sowers, *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, 3057-3064. 5-halogenated pyrimidine lesions within a CpG sequence context mimic 5-methylcytosine by enhancing the binding of the methyl-CpG-binding domain of methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2).
- [190] V. Valinluck, L. C. Sowers, *Cancer Res.* **2007**, 67, 5583-5586. Inflammation-mediated cytosine damage: a mechanistic link between inflammation and the epigenetic alterations in human cancers.
- [191] V. Valinluck, L. C. Sowers, *Cancer Res.* **2007**, 67, 946-950. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1.
- [192] M. Esteller, *Curr. Opin. Oncol.* **2005**, 17, 55-60. DNA methylation and cancer therapy: new developments and expectations.
- [193] C. B. Yoo, J. C. Cheng, P. A. Jones, *Biochem. Soc. Trans.* **2004**, 32, 910-912. Zebularine: a new drug for epigenetic therapy.
- [194] C. M. Bender, M. M. Pao, P. A. Jones, *Cancer Res.* **1998**, 58, 95-101. Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines.
- [195] W. G. Alleman, R. L. Tabios, G. V. Chandramouli, O. N. Aprelikova, C. Torres-Cabala, A. Mendoza, C. Rogers, N. A. Sopko, W. M. Linehan, J. R. Vasselli, *Clin. Cancer Res.* **2004**, 10, 7011-7021. The in vitro and in vivo effects of re-expressing methylated von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in clear cell renal carcinoma with 5-aza-2'-deoxycytidine.
- [196] V. Santini, H. M. Kantarjian, J. P. Issa, *Ann. Intern. Med.* **2001**, 134, 573-586. Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications.

- [197] F. Lyko, R. Brown, *J. Natl. Cancer Inst.* **2005**, *97*, 1498-1506. DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies.
- [198] C. Stresemann, B. Brueckner, T. Musch, H. Stopper, F. Lyko, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 2794-2800. Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines.
- [199] C. B. Yoo, P. A. Jones, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 37-50. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future.
- [200] J. P. Issa, *Curr. Opin. Oncol.* **2003**, *15*, 446-451. Decitabine.
- [201] J. K. Christman, *Oncogene* **2002**, *21*, 5483-5495. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy.
- [202] J. H. Beumer, J. L. Eiseman, R. A. Parise, E. Joseph, J. L. Holleran, J. M. Covey, M. J. Egorin, *Clin. Cancer Res.* **2006**, *24*, 7483-7491. Pharmacokinetics, metabolism, and oral bioavailability of the DNA methyltransferase inhibitor 5-fluoro-2'-deoxycytidine in mice.
- [203] X. Lin, K. Asgari, M. J. Putzi, W. R. Gage, X. Yu, B. S. Cornblatt, A. Kumar, S. Piantadosi, T. L. DeWeese, A. M. D. Marzo, W. G. Nelson, *Cancer Res.* **2001**, *61*, 8611-8616. Reversal of GSTP1 CpG island hypermethylation and reactivation of pi-class glutathione S-transferase (GSTP1) expression in human prostate cancer cells by treatment with procainamide.
- [204] B. Brueckner, R. G. Boy, P. Siedlecki, T. Musch, H. C. Kliem, P. Zielenkiewicz, S. Suhai, M. Wiessler, F. Lyko, *Cancer Res.* **2005**, *65*, 6305-6311. Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases.
- [205] W. J. Lee, B. T. Zhu, *Carcinogenesis* **2006**, *27*, 269-277. Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols.
- [206] M. Z. Fang, Y. Wang, N. Ai, Z. Hou, Y. Sun, H. Lu, W. Welsh, C. S. Yang, *Cancer Res.* **2003**, *63*, 7563-7570. Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines.
- [207] J. C. Chuang, C. B. Yoo, J. M. Kwan, T. W. Li, G. Liang, A. S. Yang, P. A. Jones, *Mol. Cancer Ther.* **2005**, *4*, 1515-1520. Comparison of biological effects of non-nucleoside DNA methylation inhibitors versus 5-aza-2'-deoxycytidine.
- [208] P. Siedlecki, R. G. Boy, T. Musch, B. Brueckner, S. Suhai, F. Lyko, P. Zielenkiewicz, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 678-683. Discovery of two novel, small-molecule inhibitors of DNA methylation.
- [209] B. H. Lee, S. Yegnasubramanian, X. Lin, W. G. Nelson, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 40749-40756. Procainamide is a specific inhibitor of DNA methyltransferase 1.
- [210] G. K. Reid, J. M. Besterman, A. R. MacLeod, *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2002**, *4*, 130-137. Selective inhibition of DNA methyltransferase enzymes as a novel strategy for cancer treatment.
- [211] M. F. Robert, S. Morin, N. Beaulieu, I. C. Chute, A. Barsalou, A. R. McLeod, *Nat. Genet.* **2003**, *33*, 61-65. DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells.
- [212] M. Fournel, P. Sapieha, N. Beaulieu, J. M. Besterman, A. R. MacLeod, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 24250-24256. Down-regulation of human DNA-(cytosine-5) methyltransferase induces cell cycle regulators p16(ink4A) and p21(WAF/Cip1) by distinct mechanisms.
- [213] S. Ramchandani, A. R. McLeod, M. Pinard, E. V. Hofe, M. Szyf, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 684-689. Inhibition of tumorigenesis by a cytosine-DNA, methyltransferase, antisense oligonucleotide.

- [214] J. D. Knox, F. D. Araujo, P. Bigey, A. D. Slack, G. B. Price, M. Zannis-Hadjopoulos, M. Szyf, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 17986-17990. Inhibition of DNA methyltransferase inhibits DNA replication.
- [215] M. Szyf, *Methods* **2002**, 27, 184-191. Utilization of antisense oligonucleotides to study the role of 5-cytosine DNA methyltransferase in cellular transformation and oncogenesis.
- [216] Y. W. Leu, F. Rahmatpanah, H. Shi, S. H. Wei, J. C. Liu, P. S. Yan, T. H. Huang, *Cancer Res.* **2003**, 63, 6110-6115. Double RNA interference of DNMT3b and DNMT1 enhances DNA demethylation and gene reactivation.
- [217] A. H. Ting, K. W. Jair, H. Suzuki, R. W. Yen, S. B. Baylin, K. E. Schuebel, *Nat. Genet.* **2004**, 36, 582-584. CpG island hypermethylation is maintained in human colorectal cancer cells after RNAi-mediated depletion of DNMT1.
- [218] M. Suzuki, N. Sunaga, D. S. Shames, S. Toyooka, A. F. Gazdar, J. D. Minna, *Cancer Res.* **2004**, 64, 3137-3143. RNA interference-mediated knockdown of DNA methyltransferase 1 leads to promotor demethylation and gene reexpression in human lung and breast cancer cells.
- [219] I. Rhee, K. E. Bachman, B. H. Park, K. W. Jair, R. W. Yen, K. E. Schuebel, H. Cui, A. P. Feinberg, C. Lengauer, K. W. Kinzler, S. B. Baylin, B. Vogelstein, *Nature* **2002**, 416, 552-556. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells.
- [220] T. Chen, S. Hevi, F. Gay, N. Tsujimoto, T. He, B. Zhang, Y. Ueda, E. Li, *Nat. Genet.* **2007**, 39, 391-396. Complete inactivation of DNMT1 leads to mitotic catastrophe in human cancer cells.
- [221] A. Villar-Garea, M. Esteller, *Current Drug Metabolism* **2003**, 4, 11-31. DNA demethylating agents and chromatin-remodelling drugs: which, how and why?
- [222] J. P. Issa, H. M. Kantarjian, P. Kirkpatrick, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, 4, 275-276. Azacytidine.
- [223] R. Schneider-Stock, M. Diab-Assef, A. Rohrbeck, C. Foltzer-Jourdainne, C. Boltze, R. Hartig, P. Schonfeld, A. Roessner, H. Gali-Muhtasib, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, 312, 525-536. 5-Aza-cytidine is a potent inhibitor of DNA methyltransferase 3a and induces apoptosis in HCT-116 colon cancer cells via Gadd45- and p53- dependent mechanisms.
- [224] A. Piskala, F. Sorm, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1964**, 29, 2060-2076. Nucleic acids components and their analogs. LI. Synthesis of 1-glycosyl derivatives of 5-azauracil and 5-azacytosine.
- [225] T. Haaf, *Pharmacol. Ther.* **1995**, 65, 19-46. The effects of 5-azacytidine and 5-azadeoxycytidine on chromosojme structure and function: implications for methylation-associated cellular processes.
- [226] D. V. Santi, A. Norment, C. E. Garrett, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, 81, 6993-6997. Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine.
- [227] C. Stresemann, F. Lyko, *Int. J. Cancer* **2008**, 123, 8-13. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine.
- [228] S. M. Taylor, P. A. Jones, *J. Mol. Biol.* **1982**, 162, 679-692. Use of 5-azacytosine-containing DNA.
- [229] P. A. Jones, S. M. Taylor, *Cell* **1980**, 20, 85-93. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation.
- [230] P. A. Jones, *Pharmacol. Ther.* **1985**, 28, 17-27. Effects of 5-azacytidine and its 2'-deoxyderivatives on cell differentiation and DNA methylation.

- [231] F. Creusot, G. Acs, J. K. Christman, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 2041-2048. Inhibition of DNA methyltransferase and induction of friend erythroleukemia cell differentiation by azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine.
- [232] R. L. Momparler, *Pharmacol. Ther.* **1985**, *30*, 287-299. Molecular, cellular and animal pharmacology of 5-aza-2'-deoxycytidine.
- [233] R. Brown, J. A. Plumb, *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2004**, *4*, 501-510. Demethylation of DNA by decitabine in cancer chemotherapy.
- [234] A. J. Murgo, *Semin. Oncol.* **2005**, *32*, 458-464. Innovative approaches to the clinical development of DNA methylation inhibitors as epigenetic remodeling drugs.
- [235] P. Fenaux, *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **2005**, *2 Suppl 1*, S36-44. Inhibitors of DNA methylation: beyond myelodysplastic syndromes.
- [236] J. C. Cheng, D. J. Weisenberger, F. A. Gonzales, G. Liang, G. L. Xu, Y. G. Hu, V. E. Marquez, P. A. Jones, *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 1270-1278. Continuous zebularine treatment effectively sustains demethylation in human bladder cancer cells.
- [237] J. C. Cheng, C. B. Matsen, F. A. Gonzales, W. Ye, S. Greer, V. E. Marquez, P. A. Jones, E. U. Selker, *J. Natl. Cancer Inst.* **2003**, *95*, 399-409. Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine.
- [238] M. Herranz, J. Martin-Caballero, M. F. Fraga, J. Ruiz-Cabello, J. M. Flores, M. Desco, V. Marquez, M. Esteller, *Blood* **2006**, *107*, 1174-1177. The novel DNA methylation inhibitor zebularine is effective against the development of murine T-cell lymphoma.
- [239] J. L. Holleran, R. A. Parise, E. Joseph, J. L. Eiseman, J. M. Covey, E. R. Glaze, A. V. Lyubimov, Y. F. Chen, D. Z. D'Argenio, M. J. Egorin, *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 3862-3868. Plasma pharmacokinetics, oral bioavailability, and interspecies scaling of the DNA methyltransferase inhibitor, zebularine.
- [240] M. L. Eidinoff, M. A. Rich, A. G. Perez, *Cancer Res.* **1959**, *19*, 638-642. Growth inhibition of a human tumor cell strain by 5-fluorocytidine and 5-fluoro-2'-deoxycytidine: reversal studies.
- [241] D. G. Osterman, G. D. DePillis, J. C. Wu, A. Matsuda, D. V. Santi, *Biochemistry* **1988**, *27*, 5204-5210. 5-Fluorocytosine in DNA is a mechanism-based inhibitor of HhaI methylase.
- [242] J. Kaysen, D. Spriggs, D. Kufe, *Cancer Res.* **1986**, *46*, 4534-4538. Incorporation of 5-fluorodeoxycytidine and metabolites into nucleic acids of human MCF-7 breast carcinoma cells.
- [243] A. M. MacMillan, L. Chen, G. L. Verdine, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2989-2991. Synthesis of an Oligonucleotide suicide substrate for DNA methyltransferases.
- [244] T. Hanck, S. Schmidt, H.-J. Fritz, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 303-309. Sequence-specific and mechanism-based crosslinking of Dcm DNA cytosine-C⁵ methyltransferase of *E.coli* K-12 to synthetic oligonucleotides containing 5-fluoro-2'-deoxycytidine.
- [245] R. L. Momparler, D. Derse, *Biochem. Pharmacol.* **1979**, *28*, 1443-1444. Kinetics of 5-aza-2'-deoxycytidine by deoxycytidine kinase.
- [246] T. Ben-Kasus, Z. Ben-Zvi, V. E. Marquez, J. A. Kelley, R. Agbira, *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *70*, 121-133. Metabolic activation of zebularine, a novel DNA methylation inhibitor, in human bladder carcinoma cells.
- [247] J. Bouchard, R. L. Momparler, *Mol. Pharmacol.* **1983**, *24*, 109-114. Incorporation of 5-aza-2'-deoxycytidine-5'-triphosphate into DNA. Interactions with mammalian DNA polymerase alpha and methylase.
- [248] A. Cihak, *Oncology* **1974**, *30*, 405-422. Biological effects of 5-azacytidine in eukaryotes.
- [249] D. V. Santi, C. E. Garrett, P. J. Barr, *Cell* **1983**, *33*, 9-10. On the mechanism of inhibition of DNA-cytosine methyltransferases by cytosine analogs.

- [250] C. Taylor, K. Ford, B. A. Connolly, D. P. Hornby, *Biochem. J.* **1993**, 291 (Pt 2), 493-504. Determination of the order of substrate addition to MspI DNA methyltransferase using a novel mechanism-based Inhibitor.
- [251] S. Milutinovic, J. D. Knox, M. Szyf, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 6353-6359. DNA methyltransferase inhibition induces the transcription of the tumor suppressor p21 (WAF1/CIP1/sdi1).
- [252] J. Y. Fang, Y. X. Cheng, J. Lu, R. Lu, L. Yang, H. Y. Zhu, W. Q. Gu, L. G. Lu, *Cell Res.* **2004**, 14, 217-226. Epigenetic modification regulates both expression of tumor-associated genes and cell cycle progressing in human colon cancer cell lines: Colo-320 and SW1116.
- [253] K. M. McGarvey, J. A. Fahrner, E. Greene, J. Martens, T. Jenuwein, S. B. Baylin, *Cancer Res.* **2006**, 66, 3541-3549. Silenced tumor suppressor genes reactivated by DNA demethylation do not return to a fully euchromatic chromatin state.
- [254] J. Pliml, F. Sorm, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1964**, 29, 2576-2578. Synthesis of 2-deoxy-D-ribofuranosyl-5-azacytosine.
- [255] M. Karon, L. Sieger, S. Leimbrock, J. Z. Finklestein, M. E. Nesbit, J. J. Swaney, *Blood* **1973**, 42, 359-365. 5-Azacytidine: a new active agent for the treatment of acute leukemia.
- [256] C. G. Moertel, A. J. Schutt, R. J. Reitemeier, R. G. Hahn, *Cancer Chemother. Rep.* **1972**, 56, 649-652. Phase II study of 5-azacytidine (NSC-102816) in the treatment of advanced gastrointestinal cancer.
- [257] S. M. Taylor, P. A. Jones, *Cell* **1979**, 17, 771-779. Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine.
- [258] B. Bruckner, F. Lyko, *Trends Pharmacol. Sci.* **2004**, 25, 551-554. DNA methyltransferase inhibitors: old and new drugs for an epigenetic cancer therapy.
- [259] M. Lubbert, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2000**, 249, 135-164. DNA methylation inhibitors in the treatment of leukemias, myelodysplastic syndromes and hemoglobinopathies: clinical results and possible mechanisms of action.
- [260] S. D. Gore, C. Jones, P. Kirkpatrick, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, 5, 891-892. Decitabine.
- [261] A. J. Weiss, G. E. Metter, T. F. Nealon, J. P. Keanan, G. Ramirez, A. Swaminathan, W. S. Fletcher, S. E. Moss, R. W. Manthai, *Cancer Treat. Rep.* **1977**, 61, 55-58. Phase II study of 5-azacytidine in solid tumors.
- [262] R. Nitschke, V. Land, C. P. Steuber, A. H. Ragab, *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **1981**, 3, 307-309. Low response rate to 5 aza-cytidine, vincristine, and prednisone therapy in previously treated childhood acute nonlymphocytic leukemia: a Southwest Oncology Group Study.
- [263] P. L. Lomen, P. Khilanani, D. Kessel, *Neoplasma* **1980**, 27, 101-106. Phase I study using combination of hydroxyurea and 5-azacytidine.
- [264] L. R. Silverman, J. F. Holland, R. S. Weinberg, B. P. Alter, R. B. Davis, R. R. Ellison, E. P. Demakos, C. J. Cornell, R. W. Carey, C. Schiffer, *Leukemia* **1993**, 7 Suppl 1, 21-29. Effects of treatment with 5-azacytidine on the in vivo and in vitro hematopoiesis in patients with myelodysplastic syndromes.
- [265] A. B. Kornblith, J. E. Herndon, L. R. Silverman, E. P. Demakos, R. Odchimar-Reissig, J. F. Holland, *J. Clin. Oncol.* **2002**, 20, 2441-2452. Impact of azacytidine on the quality of life of patients with myelodysplastic syndrome treated in a randomized phase III trial: a Cancer and Leukemia Group B study.
- [266] A. Aparicio, C. A. Eads, L. A. Leong, P. W. Laird, E. M. Newman, T. W. Synold, S. D. Baker, M. Zhao, J. S. Weber, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2003**, 51, 231-239. Phase I trial of continuous infusion 5-aza-2'-deoxycytidine.

- [267] W. E. Samlowski, S. A. Leachman, M. Wade, P. Cassidy, P. Porter-Gill, L. Busby, R. Wheeler, K. Boucher, F. Fitzpatrick, D. A. Jones, A. R. Karpf, *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 3897-3905. Evaluation of a 7-day continuous intravenous infusion of decitabine: inhibition of promotor-specific and global genomic DNA-methylation.
- [268] H. Kantarjian, J. P. Issa, C. S. Rosenfeld, J. M. Bennett, M. Albitar, J. DiPersio, V. Klimek, J. Slack, C. deCastro, F. Ravandi, R. Helmer, L. Shen, S. D. Nimer, R. Leavitt, A. Raza, H. Saba, *Cancer* **2006**, *106*, 1794-1803. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study.
- [269] L. Jackson-Grusby, P. W. Laird, S. N. Magge, B. J. Moeller, R. Jaenisch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 4681-4685. Mutagenicity of 5-aza-2'-deoxycytidine is mediated by the mammalian DNA methyltransferase.
- [270] R. L. Momparler, J. Samson, L. F. Momparler, G. E. Rivard, *Chemother. Pharmacol.* **1984**, *13*, 191-194. Cell cycle effects and cellular pharmacology of 5-aza-2'-deoxycytidine.
- [271] H. K. Kuo, J. D. Griffith, K. N. Kreuzer, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 1228-1232. Azacytidine induced methyltransferase-DNA adducts block DNA replication in vivo.
- [272] J. A. Beisler, *J. Med. Chem.* **1978**, *21*, 204-208. Isolation, characterization, and properties of a labile hydrolysis product of the antitumor nucleoside, 5-azacytidine.
- [273] K. T. Lin, R. L. Momparler, G. E. Rivard, *J. Pharm. Sci.* **1981**, *70*, 1228-1232. High-performance liquid chromatographic analysis of chemical stability of 5-aza-2'-deoxycytidine.
- [274] R. E. Notari, J. L. DeYoung, *J. Pharm. Sci.* **1975**, *64*, 1148-1157. Kinetics and mechanisms of degradation of the antileukemic agent 5-azacytidine in aqueous solutions.
- [275] P. J. Hurd, A. J. Whitmarsh, G. S. Baldwin, S. M. Kelly, J. P. Waltho, N. C. Price, B. A. Connolly, D. P. Hornby, *J. Mol. Biol.* **1999**, *286*, 389-401. Mechanism-based inhibition of C5-cytosine DNA methyltransferases by 2-H pyrimidinone.
- [276] L. Cheong, M. L. Eidinoff, M. A. Rich, *Cancer Res.* **1960**, *20*, 1602-1607. Mechanism of growth inhibition of H.Ep.#1 cells by 5-fluorodeoxycytidine and 5-fluorodeoxyuridine.
- [277] E. M. Newman, D. V. Santi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 6419-6423. Metabolism and mechanism of action of 5-fluorodeoxycytidine.
- [278] L. Liu, D. V. Santi, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1209*, 89-94. 5-Fluoro-2'-deoxycytidine 5'-monophosphate is a mechanism-based inhibitor of thymidylate synthase.
- [279] R. J. Roberts, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1285-1291. Eine verblüffende Verzerrung von DNA, hervorgerufen durch eine Methyltransferase (Nobel-Vortrag).
- [280] J. A. Mekras, D. A. Boothman, L. M. Perez, S. Greer, *Cancer Res.* **1984**, *44*, 2551-2560. Use of 5-Fluorodeoxycytidine and Tetrahydrouridine to exploit high levels of deoxycytidine deaminase in tumors to achieve DNA- and target-directed therapies.
- [281] D. A. Boothman, T. V. Briggles, S. Greer, *Cancer Res.* **1987**, *47*, 2354-2362. Tumor-selective metabolism of 5-Fluoro-2'-deoxycytidine coadministered with tetrahydrouridine compared to 5-fluorouracil in mice bearing Lewis Lung Carcinoma.
- [282] <http://www.cancer.gov/clinicaltrials/ft-NCI-06-C-0221>.
- [283] <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/related/NCT00378807>.
- [284] C. M. Bender, M. L. Gonzalgo, F. A. Gonzales, C. T. Nguyen, K. D. Robertson, P. A. Jones, *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 6690-6698. Roles of cell division and gene transcription in the methylation of CpG islands.
- [285] W. G. Zhu, G. A. Otterson, *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **2003**, *3*, 187-199. The interaction of histone deacetylase inhibitors and DNA methyltransferase inhibitors in the treatment of human cancer cells.

- [286] E. E. Cameron, K. E. Bachman, S. Myohanen, J. G. Herman, S. B. Baylin, *Nat. Genet.* **1999**, *21*, 103-107. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer.
- [287] K. Yamashita, S. Upadhyay, M. Osada, M. O. Hoque, Y. Xiao, M. Mori, F. Sato, S. J. Meltzer, D. Sidransky, *Cancer Cell* **2002**, *2*, 485-495. Pharmacologic unmasking of epigenetically silenced tumor suppressor genes in esophageal squamous cell carcinoma.
- [288] S. Jahangeer, R. M. Elliott, R. C. Henneberry, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1982**, *108*, 1434-1440. beta-Adrenergic receptor induction in HeLa cells: synergistic effect of 5-azacytidine and butyrate.
- [289] S. A. Belinsky, D. M. Klinge, C. A. Stidley, J. P. Issa, J. G. Herman, T. H. March, S. B. Baylin, *Cancer Res.* **2003**, *63*, 7089-7093. Inhibition of DNA methylation and histone deacetylation prevents murine lung cancer.
- [290] D. M. E. I. Hellebrekers, A. W. Griffioen, M. v. England, *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1775*, 76-91. Dual targeting of epigenetic therapy in cancer.
- [291] K. D. Robertson, *Oncogene* **2001**, *20*, 3139-3155. DNA methylation, methyltransferases, and cancer.
- [292] A. El-Osta, *BioEssays* **2003**, *25*, 1071-1084. DNMT cooperativity - the developing links between methylation, chromatin structure and cancer.
- [293] R. L. Mompalmer, V. Bovenzi, *J. Cell. Physiol.* **2000**, *183*, 145-154. DNA methylation and cancer.
- [294] G. Egger, S. Jeong, S. G. Escobar, C. C. Cortez, T. W. Li, Y. Saito, C. B. Yoo, P. A. Jones, G. Liang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 14080-14085. Identification of DNMT1 (DNA methyltransferase 1) hypomorphs in somatic knockouts suggests an essential role for DNMT1 in cell survival.
- [295] F. Spada, A. Haemmer, D. Kuch, U. Rothbauer, L. Schermelleh, E. Kremmer, T. Carell, G. Langst, H. Leonhardt, *J. Cell Biol.* **2007**, *176*, 565-571. DNMT1 but not its interaction with the replication machinery is required for maintenance of DNA methylation in human cells.
- [296] K. Okita, T. Ichisaka, S. Yamanaka, *Nature* **2007**, *448*, 313-317. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells.
- [297] J. Fronk, R. Magiera, *Biochem. J.* **1994**, *304 (Pt 1)*, 101-104. DNA methylation during differentiation of a lower eukaryote, *Physarum polycephalum*.
- [298] P. G. Constantinides, P. A. Jones, W. Gevers, *Nature* **1977**, *267*, 364-366. Functional striated muscle cells from non-myoblast precursors following 5-azacytidine treatment.
- [299] P. A. Jones, S. M. Taylor, T. Mohandas, L. J. Shapiro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 1215-1219. Cell cycle-specific reactivation of an inactive X-chromosome locus by 5-azadeoxycytidine.
- [300] J. Hanna, M. Wernig, S. Markoulaki, C. W. Sun, A. Meissner, J. P. Cassady, C. Beard, T. Bambrink, L. C. Wu, T. M. Townes, R. Jaenisch, *Science* **2007**, *318*, 1920-1923. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin.
- [301] K. Takahashi, S. Yamanaka, *Cell* **2006**, *126*, 663-676. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.
- [302] M. Wernig, A. Meissner, R. Foreman, T. Bambrink, M. Ku, K. Hochedlinger, B. E. Bernstein, R. Jaenisch, *Nature* **2007**, *448*, 318-324. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state.
- [303] H. R. Schoeler, *Naturwiss. Rundsch.* **2003**, *56*, 525-539. The potential of stem cells.
- [304] K. Hochedlinger, R. Jaenisch, *Nature* **2006**, *441*, 1061-1067. Nuclear reprogramming and pluripotency.

- [305] D. Kuch, L. Schermelleh, S. Manetto, H. Leonhardt, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1515-1518. Synthesis of DNA dumbbell based inhibitors for the human DNA methyltransferase Dnmt1.
- [306] D. Kuch, *Synthese und Charakterisierung neuartiger Inhibitoren für die humane DNA Methyltransferase DNMT1*, Verlag Dr. Hut, München, **2009**.
- [307] J. D. Ahn, R. Morishita, Y. Kaneda, H. S. Kim, Y. C. Chang, K. U. Lee, J. Y. Park, H. W. Lee, Y. H. Kim, I. K. Lee, *Gene Ther.* **2002**, *9*, 1682-1692. Novel E2F decoy oligodeoxynucleotides inhibit in vitro vascular smooth muscle cell proliferation and in vivo neointimal hyperplasia.
- [308] C. Clusel, E. Ugarte, N. Enjolras, M. Vasseur, M. Blumenfeld, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 3405-3411. Ex vivo regulation of specific gene expression by nanomolar concentration of double-stranded dumbbell oligonucleotides.
- [309] B. C. Chu, L. E. Orgel, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 5857-5858. The stability of different forms of double-stranded decoy DNA in serum and nuclear extracts.
- [310] M. Vives, R. Eritja, R. Tauler, V. E. Marquez, R. Gargallo, *Biopolymers* **2004**, *73*, 27-43. Synthesis, stability, and protonation studies of a selfcomplementary dodecamer containing the modified nucleoside 2'-deoxyzebularine.
- [311] L. P. McIntosh, W. S. Zielinsky, B. W. Kalisch, G. P. Pfeifer, M. Sprinzl, D. Drahovsky, J. H. v. d. Sande, T. M. Jovin, *Biochemistry* **1985**, *24*, 4806-4814. Synthesis and characterisation of poly[d(G-z5C)]. B-Z transition and inhibition of DNA methylase.
- [312] J. Kurreck, *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 1628-1644. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications.
- [313] H. Kaur, B. R. Babu, S. Maiti, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4672-4697. Perspectives on chemistry and therapeutic applications of locked nucleic acid (LNA).
- [314] I. Lebedeva, C. A. Stein, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2001**, *41*, 403-419. Antisense oligonucleotides: promise and reality.
- [315] C. A. Stein, Y. C. Cheng, *Science* **1993**, *261*, 1004-1012. Antisense oligonucleotides: promise and reality.
- [316] P. S. Miller, *Biotechnology (N. Y.)* **1991**, *9*, 358-362. Oligonucleoside methylphosphonates as antisense reagents.
- [317] M. D. Matteucci, R. W. Wagner, *Nature* **1996**, *384*, 20-22. In pursuit of antisense.
- [318] T. D. Samani, B. Jolles, A. Laigle, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2001**, *11*, 129-136. Best minimally modified antisense oligonucleotides according to cell nuclease activity.
- [319] H.-P. Vosberg, F. Eckstein, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 6595-6599. Effect of deoxynucleoside phosphorothioates incorporated in DNA on cleavage by restriction enzymes.
- [320] S. Agrawal, J. Temsamani, J. Y. Tang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 7595-7599. Pharmacokinetics, biodistribution, and stability of oligodeoxynucleotide phosphorothioates in mice.
- [321] J. Kurreck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1378-1398. RNA interference: from basic research to therapeutic applications.
- [322] E. R. Rayburn, R. Zhang, *Drug Discovery Today* **2008**, *13*, 513-521. Antisense, RNAi, and gene silencing strategies for therapy: mission possible or impossible?
- [323] A. Webb, D. Cunningham, F. d. Stefano, P. Ross, M. Corbo, Z. Dziewanowska, *Lancet* **1997**, *349*, 1137-1141. BCL-2 antisense therapy in patients with non-Hodgkin lymphoma.
- [324] R. G. Garcia, A. S. Brank, J. K. Christman, V. E. Marquez, R. Eritja, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2001**, *11*, 369-378. Synthesis of oligonucleotide inhibitors of DNA (cytosine-C5) methyltransferase containing 5-azacytosine at specific sites.

- [325] S. Schmidt, C. Pein, H. Fritz, D. Cech, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 2421-2426. Chemical synthesis of 2'-deoxynucleotides containing 5-fluoro-2'-deoxycytidine.
- [326] C. J. Marasco, J. R. Sufrin, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6363-6365. A convenient method for the direct incorporation of 5-fluoro-2'-deoxycytidine into oligodeoxynucleotides.
- [327] D. A. Brown, S.-H. Kang, S. M. Gryaznov, L. DeDionisio, O. Heidenreich, S. Sullivan, X. Xu, M. I. Nerenberg, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 26801-26805. Effect of phosphorothioate modification of oligodeoxynucleotides on specific protein binding.
- [328] P. Bigey, J. D. Knox, S. Croteau, S. K. Bhattacharya, J. Théberge, M. Szyf, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 4594-4606. Modified oligonucleotides as bona fide antagonists of proteins interacting with DNA.
- [329] F. D. Araujo, S. Croteau, A. D. Slack, S. Milutinovic, P. Bigey, G. B. Price, M. Zannis-Hajopoulos, M. Szyf, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 6930-6936. The DNMT1 target recognition domain resides in the N-terminus.
- [330] J. Goodchild, *Bioconjugate Chem.* **1990**, *1*, 165-187. Conjugates of oligonucleotides and modified oligonucleotides: a review of their synthesis and properties.
- [331] D. A. Stetsenko, M. J. Gait, *Nucleos. Nucleot. Nucleic Acids* **2000**, *19*, 1751-1764. New phosphoramidate reagents for the synthesis of oligonucleotides containing a cysteine residue useful in peptide conjugation.
- [332] D. A. Stetsenko, M. J. Gait, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4900-4908. Efficient conjugation of peptides to oligonucleotides by "Native Ligation".
- [333] S. J. Kim, E.-K. Bang, H. J. Kwon, J. S. Shim, B. H. Kim, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1517-1522. Modified oligonucleotides containing lithocholic acid in their backbones: their enhanced cellular uptake and their mimicking of hairpin structures.
- [334] Y.-H. Wang, C.-P. Chen, M.-H. Chan, M. Chang, Y.-W. Hou, H.-H. Chen, H.-R. Hsu, K. Liu, H.-J. Lee, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *346*, 758-767. Arginine-rich intracellular delivery peptides noncovalently transport protein into living cells.
- [335] C. Wolfrum, S. Shi, K. N. Jayaprakash, M. Jayaraman, G. Wang, R. K. Pandey, K. G. Rajeev, T. Nakayama, K. Charrise, E. M. Ndungo, T. Zimmermann, V. Kotliansky, M. Manoharan, M. Stoffel, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1149 - 1157. Mechanisms and optimization of *in vivo* delivery of lipophilic siRNAs.
- [336] R. Juliano, M. R. Alam, V. Dixit, H. Kang, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 4158-4171. Mechanisms and strategies for effective delivery of antisense and siRNA oligonucleotides.
- [337] J. Krützfeld, S. Kuwajima, R. Braich, K. G. Rajeev, J. Pena, T. Tuschli, M. Manoharan, M. Stoffel, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 2885-2892. Specificity, duplex degradation and subcellular localization of antagomirs.
- [338] T. Schröder, N. Niemeier, S. Afonin, A. S. Ulrich, H. F. Krug, S. Bräse, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 376-379. Peptidic amino- and guanidinium-carrier systems: targeted drug delivery into the cell cytosol or the nucleus.
- [339] <http://www.glenresearch.com/Catalog/structural.html>.
- [340] H. Aoyama, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*, 2073-2077. Stereoselective synthesis of anomers of 5-substituted 2'-deoxyuridines.
- [341] A. Krug, S. Schmidt, J. Lekschas, K. Lemke, D. Cech, *J. prakt. Chem.* **1989**, *331*, 835-842. Transformation von Uridin zu Cytidinderivaten durch selektive Aminierung.
- [342] A. Laayoun, S. S. Smith, *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 1584-1589. Methylation of slipped duplexes, snapbacks and cruciforms by human DNA (cytosine-5) methyltransferases.
- [343] J. Clark, T. Shevchuk, M. R. Kho, S. S. Smith, *Anal. Biochem.* **2003**, *321*, 50-64. Methods for the design and analysis of oligodeoxynucleotide-based DNA (cytosine-5) methyltransferase inhibitors.

- [344] C. A. Stein, C. Subasinghe, K. Shinozuka, J. S. Cohen, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 3209-3221. Physicochemical properties of phosphorothioate oligonucleotides.
- [345] L. Kibler-Herzog, B. Uznanski, G. Whittier, W. D. Wilson, *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 2979-2986. Duplex stabilities of phosphorothioate, methylphosphonate, and RNA analogs of two DNA 14-mers.
- [346] M. Boczkowska, P. Guga, W. J. Stec, *Biochemistry* **2002**, *41*, 12483-12487. Stereodefined phosphorothioate analogues of DNA: relative thermodynamic stability of the model PS-DNA/DNA and PS-DNA/RNA complexes.
- [347] G. M. Segers-Nolten, N. M. Sijtsema, C. Otto, *Biochemistry* **1997**, *36*, 13241-13247. Evidence for Hoogsteen GC base pairs in the proton-induced transition from right-handed to left-handed poly(dG-dC).poly(dG-dC).
- [348] M. E. Sanborn, B. K. Connolly, K. Gurunathan, M. Levitus, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 11064–11074. Fluorescence properties and photophysics of the sulfoindocyanine Cy3 linked covalently to DNA.
- [349] T. H. Bestor, G. L. Verdine, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1994**, *6*, 380-389. DNA methyltransferases.
- [350] T. Bestor, A. Laudano, R. Mattaliano, V. Ingram, *J. Mol. Biol.* **1988**, *203*, 971-983. Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases.
- [351] E. Uhlmann, A. Peyman, *Chemical Reviews* **1990**, *90*, 543-584. Antisense oligonucleotides: a new therapeutic principle.
- [352] J. K. Watts, G. F. Deleavy, M. J. Damha, *Drug Discovery Today* **2008**, *13*, 842-854. Chemically modified siRNA: tools and applications.
- [353] M. Sioud, *siRNA and miRNA gene silencing*, Humana Press, New York, **2009**.
- [354] R. T. Lyland, I. B. Browning, *RNA Interference research progress*, Nova Biomedical Books, New York, **2008**.
- [355] P. D. Cook, *Anticancer. Drug Des.* **1991**, *6*, 585-607. Medicinal chemistry of antisense oligonucleotides--future opportunities.
- [356] P. S. Eder, R. J. DeVine, J. M. Dagle, J. A. Walder, *Antisense Res. Dev.* **1991**, *1*, 141-151. Substrate specificity and kinetics of degradation of antisense oligonucleotides by a 3' exonuclease in plasma.
- [357] S. Narayanan, J. Gall, C. Richert, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 2901-2911. Clamping down on weak terminal base pairs: oligonucleotides with molecular caps as fidelity-enhancing elements at the 5'- and 3'-terminal residues.
- [358] A. S. Brank, R. Eritja, R. G. Garcia, V. E. Marquez, J. K. Christman, *J. Mol. Biol.* **2002**, *323*, 53-67. Inhibition of HhaI DNA (cytosine-C5) methyltransferase by oligodeoxyribonucleotides containing 5-aza-2'-deoxycytidine: examination of the intertwined roles of co-factor, target, transition state structure and enzyme conformation.
- [359] I. Rhee, K. W. Jair, R. W. Yen, C. Lengauer, J. G. Herman, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, S. B. Baylin, K. E. Schuebel, *Nature* **2000**, *404*, 1003-1007. CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1.
- [360] Dr. L. Schermelleh, Prof. Dr. H. Leonhardt, Department für Biologie II, LMU München, Großhadernerstraße 2, 82152 Martinsried (Deutschland).
- [361] P. L. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, M. Danielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 7413-7417. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure.
- [362] J. G. Herman, J. R. Graff, S. Myohanen, B. D. Nelkin, S. B. Baylin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 9821-9826. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands.

- [363] P. W. Laird, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, 3, 253-266. The power and the promise of DNA methylation markers.
- [364] B. H. Ramsahoye, *Methods* **2002**, 27, 156-161. Measurement of genome wide DNA methylation by reversed-phase high-performance liquid chromatography.
- [365] M. F. Fraga, E. Uriol, L. B. Diego, M. Berdasco, M. Esteller, M. J. Canal, R. Rodriguez, *Electrophoresis* **2002**, 23, 1677-1681. High-performance capillary electrophoretic method for the quantification of 5-methyl-2'-deoxycytidine in genomic DNA: application to plant, animal and human cancer tissues.
- [366] K. S. Guerrero, A. R. Vasquez, B. Segura-Pacheco, A. Duenas-Gonzalez, *Electrophoresis* **2005**, 26, 1057-1062. Determination of 5-methyl-cytosine and cytosine in tumor DNA of cancer patients.
- [367] O. Shimelis, X. Zhou, G. Li, R. W. Giese, *J. Chromatogr. A* **2004**, 1053, 143-149. Phenolic extraction of DNA from mammalian tissues and conversion to deoxyribonucleoside-5'-monophosphates devoid of ribonucleotides.
- [368] C. W. Gehrke, R. A. McCune, M. A. Gama-Sosa, M. Ehrlich, K. C. Kuo, *J. Chromatogr.* **1984**, 301, 199-219. Quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography of major and modified nucleosides in DNA.
- [369] L. Song, S. R. James, L. Kazim, A. R. Karpf, *Anal. Chem.* **2005**, 77, 504-510. Specific method for the determination of genomic DNA methylation by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry.
- [370] D. Stach, O. J. Schmitz, S. Stilgenbauer, A. Benner, H. Dohner, M. Wiessler, F. Lyko, *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31, E2. Capillary electrophoretic analysis of genomic DNA methylation levels.
- [371] M. Wirtz, D. Stach, H. C. Kliem, M. Wiessler, O. J. Schmitz, *Electrophoresis* **2004**, 25, 839-845. Determination of the DNA methylation level in tumor cells by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection.
- [372] P. F. Crain, *Methods Enzymol.* **1990**, 193, 782-790. Preparation and enzymatic hydrolysis of DNA and RNA for mass spectrometry.
- [373] S. Warncke, A. Gégout, T. Carell, *ChemBioChem* **2009**, 10, 728-734. Phosphorothioation of oligonucleotides strongly influences the inhibition of bacterial (M.HhaI) and human (Dnmt1) DNA methyltransferases.
- [374] A. H. Bolden, C. M. Nalin, C. A. Ward, M. S. Poonian, A. Weissbach, *Mol. Cell Biol.* **1986**, 6, 1135-1140. Primary DNA sequence determines sites of maintenance and de novo methylation by mammalian DNA methyltransferases.
- [375] V. E. Marquez, M.-I. Lim, *Med. Res. Rev.* **1986**, 6, 1-40. Carbocyclic nucleosides.
- [376] B. M. Dominguez, P. M. Cullis, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 5783-5786. 2-Azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-one epoxide: A versatile intermediate for the synthesis of cyclopentyl carbocyclic 2-deoxy-, 3-deoxy- & ara- ribonucleoside analogues.
- [377] B. B. Lim, V. E. Marquez, K. A. Dobyns, D. A. Cooney, E. D. Clercq, *Nucleosides & Nucleotides* **1992**, 11, 1123-1135. Synthesis and biological study of the cyclopentenyl carbocyclic nucleoside analogue of 5-azacytidine.
- [378] P. Pithová, A. Piskala, J. Pitha, F. Šorm, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1965**, 30, 2801-2811. Nucleic acids components and their analogs. LXVI. Hydrolysis of 5-azacytidine and its connection with biological activity.
- [379] M. V. Berridge, A. S. Tan, K. D. McCoy, R. Wang, *Biochemica* **1996**, 4, 15-19. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts.
- [380] H. J. Jessen, W. Fendrich, C. Meier, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 924-931. Synthesis and properties of fluorescent cycloSal nucleotides m5K and its 2',3'-dideoxy analog dm5K.

- [381] C. Meier, J. Balzarini, *Antiviral Research* **2006**, *71*, 282-292 Application of the cycloSal-prodrug approach for improving the biological potential of phosphorylated biomolecules
- [382] A. H. Ting, K. W. Jair, K. E. Schuebel, S. B. Baylin, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 729-735. Differential requirement for DNA methyltransferase 1 in maintaining human cancer cell gene promoter hypermethylation.
- [383] R. Huisgen, *Angew. Chem.* **1963**, *2*, 565-632. 1,3-Dipolar cycloadditions. Past and Future.
- [384] R. Huisgen, *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*, Wiley, New York, **1984**.
- [385] <http://www.scripps.edu/chem/sharpless/click.html>.
- [386] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-Triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides.
- [387] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599. A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective ligation of azides and terminal alkynes.
- [388] J. Lahann, *Click Chemistry for Biotechnology and Materials Science*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, **2009**.
- [389] V. Aucagne, D. A. Leigh, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4505-4507. Chemoselective formation of successive triazole linkages in one pot: "click-click" chemistry.
- [390] J. Marik, J. L. Sutcliffe, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6681-6684. Click for PET: rapid preparation of [¹⁸F]fluoropeptides using Cu^I catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition.
- [391] H.-J. Musiol, S. Dong, M. Kaiser, R. Bausinger, A. Zumbusch, U. Bertsch, L. Moroder, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 625-628. Toward semisynthetic lipoproteins by convergent strategies based on click and ligation chemistry.
- [392] A. J. Link, M. L. Mock, D. A. Tirrell, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 603-609. Non-canonical amino acids in protein engineering.
- [393] K. E. Beatty, F. Xie, Q. Wang, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14150-14151. Selective dye-labeling of newly synthesized proteins in bacterial cells.
- [394] N. S. Hatzakis, H. Engelkamp, K. Velonia, J. Hofkens, P. C. M. Christiansen, A. Svendsen, S. A. Patkar, J. Vind, J. C. Maan, A. E. Rowan, R. J. M. Nolte, *Chem. Commun.* **2006**, 2012-2014. Synthesis and single enzyme activity of a clicked lipase-BSA hetero-dimer.
- [395] A. Deiters, T. A. Cropp, M. Mukherji, J. W. Chin, J. C. Anderson, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11782-11783. Adding amino acids with novel reactivity to the genetic code of *Saccharomyces cerevisiae*.
- [396] A. Deiters, G. Schultz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1521-1524. In vivo incorporation of an alkyne into proteins in *Escherichia coli*.
- [397] T. Fekner, X. Li, M. M. Lee, M. K. Chan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1633-1635. A pyrrolysine analogue for protein click chemistry.
- [398] W. Li, A. Mahapatra, D. G. Longstaff, J. Bechtel, G. Zhao, P. T. Kang, M. K. Chan, J. A. Krzycki, *J. Mol. Biol.* **2009**, *385*, 1156-1164. Specificity of pyrrolysyl-tRNA synthetase for pyrrolysine and pyrrolysine analogs.
- [399] D. P. Nguyen, H. Lusic, H. Neumann, P. B. Kapadnis, A. Deiters, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8720-8721. Genetic encoding and labeling of aliphatic azides and alkynes in recombinant proteins via a pyrrolysyl-tRNA synthetase/tRNA CUA pair and click chemistry.
- [400] T. Liebert, C. Hänsch, T. Heinze, *Macromol. Rapid Commun.* **2006**, *27*, 208-213. Click Chemistry with polysaccharides.

- [401] S. S. Gupta, K. S. Raja, E. Kaltgrad, E. Strable, M. G. Finn, *Chem. Commun.* **2005**, 4315-4317. Virus–glycopolymer conjugates by copper(I) catalysis of atom transfer radical polymerization and azide–alkyne cycloaddition.
- [402] S. S. Gupta, J. Kuzelka, P. Singh, W. G. Lewis, M. Manchester, M. G. Finn, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1572-1579. Accelerated bioorthogonal conjugation: a practical method for the ligation of diverse functional molecules to a polyvalent virus scaffold.
- [403] C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1109-1152. Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission.
- [404] S. Thyagarajan, N. N. Murthy, A. Sargeant, K. D. Karlin, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7003-7008. Selective DNA strand scission with binuclear copper complexes: implications for the involvement of a Cu₂-O₂ active species.
- [405] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853-2855. Polytriazoles as copper(I)-stabilizing ligands in catalysis.
- [406] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 2 ed., Elsevier, London, **2008**.
- [407] M. Meldal, C. W. Tornøe, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952–3015. Cu-catalyzed azide–alkyne cycloaddition.
- [408] P. M. E. Gramlich, C. T. Wirges, A. Manetto, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8350-8358. Postsynthetic DNA modification through the copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition reaction.
- [409] J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. E. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3639-3642. Click chemistry as a reliable method for the high-density postsynthetic functionalization of alkyne-modified DNA.
- [410] C. D. Hein, X. Liu, D. Wang, *Pharmaceutical Research* **2008**, *25*, 2216-2230. Click chemistry, a powerful tool for pharmaceutical sciences.
- [411] P. M. E. Gramlich, *Selective DNA modification using the Cu(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition*, Cuvillier Verlag, München, **2008**.
- [412] B. L. Droumaguet, K. Velonia, *Macromol. Rapid Commun.* **2008**, *29*, 1073–1089. Click chemistry: A powerful tool to create polymer-based macromolecular chimeras.
- [413] W. H. Binder, R. Sachsenhofer, *Macromol. Rapid Commun.* **2008**, *29*, 952–981. ‘Click’ chemistry in polymer and material science: An update.
- [414] F. Amblard, J. H. Cho, R. F. Schinazi, *Chem. Rev.* **2009**, *Article ASAP*, Cu(I)-catalyzed Huisgen azide–alkyne 1,3-dipolar cycloaddition reaction in nucleoside, nucleotide, and oligonucleotide chemistry.
- [415] P. M. E. Gramlich, S. Warncke, J. Gierlich, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3442-3444. Click-click-click: single to triple modification of DNA.
- [416] A. Schlossbauer, Prof. Dr. T. Bein, Department für Chemie und Biochemie, LMU München, Butenandtstraße 11, 81377 München (Deutschland).
- [417] R. B. Mujumdar, L. A. Ernst, S. R. Mujumdar, C. J. Lewis, A. S. Waggoner, *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 105-111. Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters.
- [418] R. Tugyi, K. Uray, D. Ivan, E. Feller, A. Perkins, F. Hudecz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 413-418. Partial D-amino acid substitution: Improved enzymatic stability and preserved Ab recognition of a MUC2 epitope peptide.
- [419] M. Sela, E. Zisman, *The FASEB journal* **1997**, *11*, 449-456. Different roles of D-amino acids in immune phenomena.
- [420] R. Breinbauer, M. Koehn, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 1147-1149. Azide-alkyne coupling: A powerful reaction for bioconjugate chemistry.
- [421] J. Lutz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1018-1025. 1,3-Dipolar cycloadditions of azides and alkynes: A universal ligation tool in polymer and materials science.

- [422] K. Gogoi, M. V. Mane, S. S. Kunte, V. A. Kumar, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 139-147. A versatile method for the preparation of conjugates of peptides with DNA/PNA/analog by employing chemo-selective click reaction in water.
- [423] M. Nakane, S. Ichikawa, A. Matsuda, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1842-1851. Triazole-linked dumbbell oligodeoxynucleotides with NF-KB binding ability as potential decoy molecules.
- [424] H. Lakhiari, E. Legendre, D. Muller, J. Jozefonvicz, *J. Chromatogr., B.* **1995**, *664*, 163-173. High-performance affinity chromatography of insulin on coated silica grafted with sialic acid
- [425] G. A. Ozin, C. Gil, *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 1749-1764. Intrazeolite organometallics and coordination complexes: internal versus external confinement of metal guests.
- [426] J. Sun, H. Zhang, R. Tian, D. Ma, X. Bao, D. S. Su, H. Zou, *Chem. Commun.* **2006**, 1322-1324. Ultrafast enzyme immobilization over large-pore nanoscale mesoporous silica particles.
- [427] D. R. Radu, C.-Y. Lai, K. Jeftinija, E. W. Rowe, S. Jeftinija, V. S.-Y. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13216-13217. A polyamidoamine dendrimer-capped mesoporous silica nanosphere-based gene transfection reagent.
- [428] I. Slowing, B. G. Trewyn, V. S.-Y. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14792-14793. Effect of surface functionalization of MCM-41-type mesoporous silica nanoparticles on the endocytosis by human cancer cells.
- [429] Y.-S. Lin, C.-P. Tsai, H.-Y. Huang, C.-T. Kuo, Y. Hung, D.-M. Huang, Y.-C. Chen, C.-Y. Mou, *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 4570-4573. Well-ordered mesoporous silica nanoparticles as cell markers.
- [430] S. Giri, B. G. Trewyn, V. S.-Y. Lin, *Nanomedicine* **2007**, *2*, 99-111. Mesoporous silica nanomaterial-based biotechnological and biomedical delivery systems.
- [431] I. I. Slowing, B. G. Trewyn, S. Giri, V. S.-Y. Lin, *Adv. Funct. Mater.* **2007**, *17*, 1225 - 1236. Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery and biosensing applications.
- [432] K. K. Coti, M. E. Belowich, M. Liong, M. W. Ambrogio, Y. A. Lau, H. A. Khatib, J. I. Zink, N. M. Khashab, J. F. Stoddart, *Nanoscale* **2009**, *1*, 16-39. Mechanised nanoparticles for drug delivery.
- [433] A. Schlossbauer, J. Kecht, T. Bein, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3092-3095. Biotin-Avidin as a protease-responsive cap system for controlled guest release from colloidal mesoporous silica.
- [434] J. Kecht, A. Schlossbauer, T. Bein, *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 7207-7214. Selective functionalization of the outer and inner surfaces in mesoporous silica nanoparticles.
- [435] A. Schlossbauer, *Biofunctionalized colloidal mesoporous silica*, (Diplomarbeit) München, **2007**.
- [436] L. Pugliese, A. Coda, M. Malcovati, M. Bolognesi, *J. Mol. Biol.* **1993**, *231*, 698-710. Three-dimensional structure of the tetragonal crystal form of egg-white avidin in its functional complex with biotin at 2.7 Å resolution.
- [437] V. Valinluck, P. Liu, J. I. Kang, Jr., A. Burdzy, L. C. Sowers, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 3057-3064. 5-halogenated pyrimidine lesions within a CpG sequence context mimic 5-methylcytosine by enhancing the binding of the methyl-CpG-binding domain of methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2).
- [438] L. Song, S. R. James, L. Kazim, A. R. Karpf, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 504-510. Specific method for the determination of genomic DNA methylation by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry.
- [439] P. F. Crain, *Methods Enzymol.* **1990**, *193*, 782-790. Preparation and enzymatic hydrolysis of DNA and RNA for mass spectrometry.

- [440] I. I. Slowing, J. L. Vivero-Escoto, C.-W. Wu, V. S. Y. Lin, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 1278-1288. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers.

Curriculum vitae**Persönliche Daten**

Name:	Simon Kristian Warncke	Familienstand:	ledig
Geburtsdatum:	05. 11. 1977	Staatsangehörigkeit:	deutsch
Geburtsort:	München		

Schul Ausbildung

1984–1988	Peslmüller Grundschule
1989–1997	Max-Planck Gymnasium; Abitur (Ø 2.0)

Zivildienst

1997–1998	Ambulanz des Kreiskrankenhauses Pasing
-----------	--

Hochschulstudium

1998–2000	Studium der Chemie an der Technischen Universität München
2000	Vordiplom (Ø 2.3)
2001–2004	Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
2004	Diplom-Hauptprüfung (Ø 1.1)
2004–2005	Diplomarbeit bei <i>Prof. Dr. Thomas Carell</i> zur „Synthese von keton-funktionalisierten Distamycin-Derivaten zur selektiven Schädigung von DNA“. (Note 1.3)
2005	Diplom (Gesamtnote 1.2)

Promotion

2005-2008	Doktorand in der Arbeitsgruppe von <i>Prof. Dr. Thomas Carell</i>
-----------	---

seit Nov. 2008 Manager R&D bei der baseclick GmbH